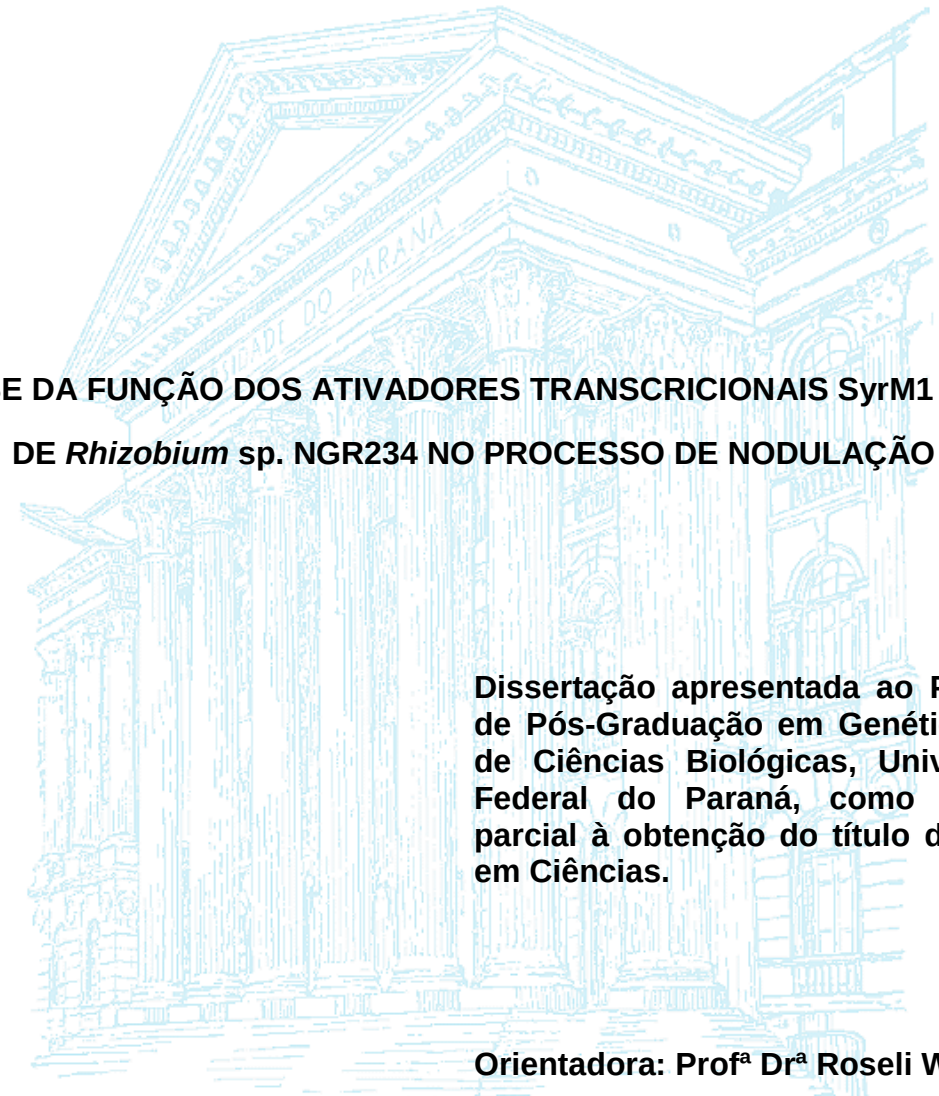
JANAINA DE SENA



ANÁLISE DA FUNÇÃO DOS ATIVADORES TRANSCRICIONAIS SyrM1 e SyrM2 DE *Rhizobium* sp. NGR234 NO PROCESSO DE NODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profª Drª Roseli Wassem

Coorientadora: Profª Drª Ana Claudia Bonatto

Curitiba

2013

Aos meus
amados pais,
Zeni e Marco.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Prof[a]. Dr[a]. Roseli Wassem pela oportunidade e por toda ajuda que me prestou nesses dois anos. Sua orientação e seus ensinamentos foram essenciais não só na realização desse trabalho, mas também no meu crescimento pessoal e profissional. Além disso, sua enorme dedicação e competência me servirão de exemplo por toda a vida! Sou muito grata também pelas conversas e por toda compreensão e paciência que teve comigo nos meus momentos de fraqueza ou dificuldades pessoais. Com carinho e admiração... muito obrigada!

Agradeço também, à Prof[a]. Dr[a]. Ana Claudia Bonatto e ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo acompanhamento durante o desenvolvimento desse trabalho e por todas as sugestões, correções, discussões e conhecimentos concedidos. Ainda à Prof[a]. Dr[a]. Ana Claudia Bonatto agradeço pela co-orientação, ótimo convívio no laboratório e pelas palavras de incentivo. Muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer ao Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo suporte intelectual e estrutural, e também a todos os funcionários e professores do Departamento de Genética da UFPR que participaram dessa conquista. Em especial à Ana Luiza, por sua companhia, disposição à ajudar e por ter de fato me ajudado inúmeras vezes, não só com o preparo de soluções e material de trabalho, como também com sua amizade, apoio e conselhos nos momentos difíceis. Ana, muito obrigada também por todos os deliciosos bolinhos! Sempre me lembrarei com muito carinho de você!!

Muito obrigada também à todas as pessoas que em algum momento foram meus colegas de laboratório: Carol e Carolzinha, Poli e Poli Mazur, Najara, Jeferson, Pedranne, Bárbara, Douglas, Karen e Karen Kubo, Mari, Vanessa, Ana Luiza, Kyane, Gabriel, Mayra, Joseph e Geisa. Alguns de vocês realmente acompanharam e participaram do meu trabalho, muitos me ensinaram as técnicas de laboratório, outros eu infelizmente não tive oportunidade de conviver por muito tempo, mas todos vocês fizeram parte dessa etapa da minha vida e tornaram ela muito mais agradável. Sentirei muitas saudades de todos vocês!

Com carinho, quero agradecer aos meus amigos da faculdade e da vida, que me apoiaram nas minhas escolhas, compreenderam minha ausência em muitos momentos e me ajudaram a nunca desistir dos meus objetivos, por mais dura que tenha sido a trajetória. Vocês constituem a parte mais bonita da minha jornada. Muito obrigada!

Um agradecimento especial vai para minha família, a quem eu devo tudo o que sou e o que conquistei. Em especial ao meu pai Marco e meus irmãos Juliana e Ricardo, a quem amo incondicionalmente.

À minha amada mãe Zeni e ao Alan quero dizer que se não fosse por vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida e serei eternamente grata por tudo que vocês fizeram por mim. Muito obrigada por todo suporte emocional, e muitas vezes financeiro também, pelo apoio, pelo colo, pela ajuda e pela compreensão. Também gostaria de pedir desculpas pelo meu intenso mal humor nos momentos de tensão. Eu amo vocês!

“Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.

John Lennon

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES v
LISTA DE QUADROS E TABELAS vi
RESUMO vii
ABSTRACT viii
1. INTRODUÇÃO 9
2. OBJETIVOS 11
2.1 OBJETIVO GERAL 11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 11
3. REVISÃO DE LITERATURA 12
3.1 FLAVONÓIDES 13
3.2 GENES E FATORES DE NODULAÇÃO 14
3.3 REGULAÇÃO DOS GENES DE NODULAÇÃO 17
4. ARTIGO:EFEITO DE SyrM1 E SyrM2 NA CASCATA REGULATÓRIA DE NODULAÇÃO EM *Rhizobium*sp. NGR234 26
5. DISCUSSÃO 51
6. CONCLUSÃO 63
REFERÊNCIAS 65
APÊNDICES 74
ANEXOS 104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *Rhizobium* sp. NGR234.....25

FIGURA 1 (artigo) - INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS DE *y4xD*, *nodD2* e *nopB*. 30

FIGURA 2 (artigo) - INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS *nodPQ* E *rhcC1*.....32

FIGURA 3 (artigo) - ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA COM SyrM2.....34

FIGURA 4 (artigo) - FENÓTIPO DA PARTE AÉREA.....36

FIGURA 5 (artigo) - MODELO PROPOSTO POR ESTE TRABALHO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *Rhizobium* sp. NGR234.....41

FIGURA 6(artigo) - INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS *nodPQ* e *rhcC1*.....50

FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO POR ESTE TRABALHO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *Rhizobium* sp. NGR234.....57

FIGURA 8 - ESQUEMA DA DELEÇÃO EM *syrM1* E CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pK18-Δ*syrM1*.....92

FIGURA 9 - ESQUEMA DA DELEÇÃO EM *syrM2* E CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pK18-Δ*syrM2*.....94

FIGURA 10 - FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE p*nodPQ* e p*y4xD* COM *gfp*.....96

FIGURA 11 - FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE p*nopB* e p*rhcC1* COM *gfp*.....97

FIGURA 12 - CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET28-*syrM1* e pET28-*syrM2*.....99

FIGURA 13 - SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SyrM2-HIS.....101

FIGURA 14 - SOLUBILIZAÇÃO DE SyrM1-His A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO.....102

FIGURA 15 - PURIFICAÇÃO DE SyrM1-His.....102

FIGURA 16 - PROTEÍNAS PURIFICADAS POR COLUNA HI-TRAP CHELATING HP.....103

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS.....79
QUADRO 2 - ESTIRPES UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO 82
QUADRO 3 - PLASMÍDEOS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXPERIMENTO DE NODULAÇÃO REALIZADO COM AS ESTIPES NGR234, NGRΔ*syrM1*, NGRΔ*syrM2* E NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*.....37

RESUMO

Rhizobium sp. NGR234 é um bacilo gram-negativo pertencente à família Rhizobiaceae que tem a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica e induzir a formação de nódulos radiculares com 112 gêneros da família Fabaceae, sendo considerado um simbionte promíscuo em comparação com outros rizóbios. Sabe-se que a expressão de genes envolvidos na nodulação e fixação de nitrogênio em *Rhizobium* sp. NGR234 é controlada por uma complexa cascata regulatória cujo regulador chave é NodD1. No entanto, outros ativadores transcricionais, tais como SyrM1 e SyrM2, também estão envolvidos no controle dessa cascata e ainda não possuem suas funções muito bem esclarecidas. No presente trabalho, foram construídas estirpes mutantes nos genes *syrM1* e *syrM2*, além de uma estirpe duplo mutante *syrM1*/*syrM2*. Essas estirpes mutantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de nodulação, sendo possível observar que SyrM2 aumenta o número de nódulos nas raízes de *Phaseolus vulgaris* e diminui a nodulação em *Tephrosia vogelii, Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*. Uma complementaridade das atividades de SyrM1 e SyrM2, que é hospedeiro-específica, também foi observada em *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*. A análise da expressão de potenciais genes alvo mostrou que os genes *rhcC1* e *nodPQ* possuem expressão constitutiva, não sendo induzidos por flavonóides nem regulados por SyrM1 ou SyrM2. Também foi observado que SyrM2 pode estar diretamente envolvido na ativação de *y4xD* e *nodD2* e é capaz de aumentar indiretamente a expressão de *nopB.* Ensaios de EMSA (ensaio de alteração da mobilidade eletroforética) confirmaram que SyrM2 reconhece e interage fisicamente com a região regulatória de *y4xD* e *nodD2*. Além disso, SyrM1 pode desempenhar uma atividade repressora em *y4xD* e *nopB*, que atenua os níveis de expressão desses genes.

Palavras-chave: *Rhizobium* sp. NGR234, nodulação, *syrM1* e *syrM2*.

ABSTRACT

Rhizobium sp. NGR234 is a gram-negative bacillus belonging to the family Rhizobiaceae that has the ability to establish a symbiotic relationship and induce the development of root nodules with 112 genera of the family Fabaceae; it is considered a promiscuous microsymbiont compared with other rhizobia. It is known that expression of genes involved in nodulation and nitrogen fixation of *Rhizobium* sp.NGR234 is controlled by a complex cascade whose regulatory key regulator is NodD1. However, other transcriptional activators, such as SyrM1 and SyrM2, are also involved in the control of this cascade and their functions have not been clearly established. In the presentstudy, we constructed mutant strains in both *syrM1* and *syrM2* genes and a double mutant strain *syrM1*/*syrM2*. These mutant strains were evaluated for their ability to nodulate host plants, revealing that *syrM2* increases the number of nodules on the roots of *Phaseolus vulgaris* and decreases in*Tephrosia vogelii*, *Macroptilium atropurpureum* and *Vigna unguiculata*. A potential complementary activity of *syrM1syrM2*, which is host-specific, was also observed in *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* and *Vigna unguiculata*. Analysis of the expression of potential target genes showed that rhcC1 and nodPQ genes have constitutive expression and are not regulated by *syrM1* or *syrM2* and are not induced by flavonoids. It was also observed that SyrM2 may be directly involved in activating *y4xD* and *nodD2* and can indirectly increase the expression of *nopB*. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays) assays confirmed that SyrM2 recognizes and physically interacts with the regulatory region of *y4xD* and *nodD2*. Furthermore, a SyrM1may act as a repressor of *y4xD* and *nopB* genes, which attenuates the expression levels of these genes.

Key-words: *Rhizobium* sp. NGR234, nodulation, *syrM1* e *syrM2*.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias dos gêneros *Sinorhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium* e *Rhizobium* são organismos capazes de estabelecer uma relação simbiótica com plantas da família Fabaceae, onde fornecem nitrogênio fixado à planta em troca de nutrientes (VIPREY *et al*., 2000). Um dos pontos importantes da simbiose é o estabelecimento da interação que culmina na formação de órgãos especializados nas raízes das plantas hospedeiras, os nódulos. Esse processo envolve uma intensa comunicação molecular entre os organismos envolvidos, podendo ser extremamente específica, como no caso da bactéria *Rhizobium etli,* que interage eficientemente apenas com espécies de *Phaseolus,* ou promíscua como em *Rhizobium* sp. NGR234, que é capaz de estabelecer a simbiose com 232 espécies de legumes de 112 diferentes gêneros (PUEPPKE e BROUGHTON, 1999).

A interação simbiótica é iniciada através da liberação de flavonóides pela planta, que estimulam a expressão de genes dos rizóbios necessários para a nodulação (genes *nod*). Em resposta, as bactérias produzem moléculas químicas, chamadas de fatores Nod, que desencadeiam uma via de transdução de sinais no hospedeiro, culminando na expressão de genes simbióticos planta-específicos que promovem o desenvolvimento nodular (PERRET *et al*., 2000; DÉNARIÉ *et al*., 1992).

A regulação de genes *nod* varia de acordo com a espécie de rizóbio, mas é quase sempre mediada pelo regulador transcricional NodD (PERRET *et al*., 2000). Em NGR234 uma cascata regulatória envolvendo *nodD1, nodD2, syrM1,syrM2* e *ttsI* foi descrita por Kobayashi e colaboradores (2004). NodD1 é o regulador chave dessa cascata. Esse ativador reconhece os flavonóides e promove uma resposta que envolve a indução da expressão de SyrM2, que por sua vez ativa a transcrição de *nodD2.* NodD2 atua na repressão de genes *nod*, através da repressão de *nodD1*, e na otimização da ativação de alguns *nod-boxes* (KOBAYASHI *et al.,* 2004). Além disso, NodD1 também atua na indução da transcrição de *ttsI,* que codificaum ativador transcricional responsável pela regulação do sistema de secreção de tipo III (TTSS) que é completo e simbioticamente ativo em NGR234. No entanto, até o momento nem todos os passos dessa cascata em NGR234 foram desvendados. SyrM2 pode estar envolvido na regulação de outros genes além de *nodD2*, que ainda não foram determinados. Além disso, os possíveis alvos e a função de SyrM1

ainda não são conhecidos. Alguns genes, tais como *nopB* e *rhcC1* quepertencem ao TTSS, já foram apontados como possíveis alvos de SyrM1 (HANIN *et al*., 1998). Um possível sítio *syrM-box* foi encontrado na região regulatória de *nodD2* e *y4xD*, confirmando a regulação de *nodD2* por SyrM2 e sugerindo uma possível ação de SyrM1 ou SyrM2 no promotor do gene *y4xD*, que ainda não possui função conhecida (KOBAYASHI *et al.,* 2004). Foi sugerido que SyrM1 pode estar envolvida no controle da síntese de fatores Nod sulfatados através da indução dos genes *nodPQ* (HANIN *et al*., 1998), que codificam enzimas necessárias para biossíntese do doador de sulfato ativado (PAPS) (BARNETT, 2004; MULLIGAN E LONG, 1989). Contudo, o exato papel dos ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2 na regulação gênica citada acima ainda precisa ser confirmada, sendo objeto deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a função dos ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2 na cascata regulatória que controla o processo de nodulação em *Rhizobium* sp. NGR234, bem como seu efeito sobre o fenótipo de nodulação.

2.2 Objetivos específicos

- Construir a estirpe mutante por deleção no gene *syrM1;*
- Construir a estirpe mutante por deleção no gene *syrM2;*
- Construir a estirpe duplo mutante por deleção nos genes *syrM1* e *syrM2;*
- Investigar a influência dos ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2 no fenótipo de nodulação;
- Avaliar a função de SyrM1 e SyrM2 na cascata de nodulação através da análise de expressão gênica de potenciais alvos;
- Confirmar a capacidade de ligação de SyrM1 e SyrM2 ao potencial *syrM-box* através do Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética (EMSA).

3. REVISÃO DE LITERATURA

Diversas bactérias de vida livre do solo são capazes de estabelecer uma relação simbiótica com plantas leguminosas da família Fabaceae e realizar o importante processo de fixação biológica do nitrogênio. Esses microorganismos incluem os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, e *Rhizobium*, sendo coletivamente chamados de rizóbios (PERRET *et al.,* 2000).

Rhizobium sp. NGR234 é um bacilo gram-negativo pertencente à família Rhizobiaceae (TRINICK*,* 1980), que tem a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com 112 gêneros da família Fabaceae, além de uma planta não leguminosa, *Parasponia andersonii*, sendo considerado um simbionte promíscuo em comparação com outros rizóbios que possuem uma faixa de hospedeiros muito mais restrita (PUEPPKE e BROUGHTON, 1999). O genoma deste microssimbionte é fracionado em três replicons, totalizando aproximadamente 6,9 Mbp: um cromossomo de aproximadamente 3,93 Mbp (cNGR234) que codifica a maioria das moléculas necessárias para o crescimento celular, um megaplasmídeo de 2,43 Mbp (pNGR234b) e, um plasmídeo simbiótico (pNGR234a) de 536 Kb que não carrega nenhum gene essencial para a sobrevivência da bactéria (SCHMEISSER *et al*., 2009).

Para que a simbiose seja eficiente, a redução do nitrogênio atmosférico deve ser realizada num ambiente protegido da presença de oxigênio onde a enzima Nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio, permanece ativa. Em muitas interações esse problema é resolvido pelo desenvolvimento de um órgão especializado na raíz, o nódulo (GAGE, 2004). Apesar de muitas plantas e bactérias serem capazes de entrar em simbiose com mais de um parceiro, apenas combinações certas resultam na formação de nódulos fixadores de nitrogênio. Essa especificidade entre parceiros compatíveis minimiza as chances de infecção por patógenos e a formação de associações ineficazes que são prejudiciais a ambos os simbiontes. Por esse motivo os processos de formação do nódulo e invasão das bactérias compatíveis envolvem uma intensa troca de sinais moleculares entre os participantes da interação (PERRET *et al*., 2000).

A planta libera várias substâncias nos exsudatos das raízes, tais como aminoácidos, CO_2, hormônios, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, açúcares,

vitaminas, polissacarídeos e enzimas (PHILLIPS e STREIT, 1996). Entre estas substâncias excretadas, os compostos aromáticos chamados flavonóides são responsáveis por atrair quimiotaxicamente os rizóbios (SCHMIDT *et al*., 1994). Segundo Gibson e colaboradores (2008) a capacidade dos compostos fenólicos funcionarem como quimiotáxicos sugere que certosaspectos da especificidade são estabelecidos antes mesmo da bactéria fazer contato físico com seu hospedeiro. Apesar disso, a principal função dos flavonóides é estimular a expressão de genes de nodulação comuns na bactéria (genes *nod*) (CAETANO-ANOLLES *et al*., 1988).

3.1 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são moléculas do metabolismo secundário de plantas, formados por dois anéis benzênicos que se unem através de um anel pirano. São responsáveis pela pigmentação de folhas e flores, agem como filtro de luz UV, tem atividade inibitória da infecção por microrganismos patogênicos, entre outras funções (REDDY *et al*., 2007). Diversos tecidos vegetais produzem flavonóides, que sãoliberados continuamente e em baixas quantidades, mas que podem ser aumentadas pela presença de rizóbios compatíveis na rizosfera (SCHMIDT *et al*., 1994; VAN BRUSSEL *et al*., 1990).

Rizóbios respondem aos flavonóides por meio das proteínas regulatórias NodD. Essas proteínas agem como sensores ambientais e ativadores da transcrição dos genes de nodulação (*nod, nol e noe*), resultando na produção e liberação de substâncias chamadas de fatores de nodulação (fatores Nod) que afetam profundamente as raízes das leguminosas, permitindo que a nodulação ocorra(PERRET *et al*., 2000; JONES *et al*., 2007). Embora os flavonóides sejam essenciais para o processo de nodulação, a interação entre flavonóides e NodD não resulta necessariamente em transcrição. Alguns flavonóides podem se ligar a NodD, mas não permitem que esta ative a transcrição de genes *nod* (PECK *et al*., 2006). Além disso, segundo Begum e colaboradores (2001), em alguns casos os flavonóides podem atuar como indutores de nodulação por alguns rizóbios e como antagonistas por outros. As isoflavonas por exemplo são indutores de *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium* sp. NGR234, mas antagonistas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ebv. *viciae*. Alguns pesquisadores sugerem que, na presença de um flavonóide apropriado, a interação de NodD ao seu sítio de

ligação induz uma curvatura no DNA, permitindo assim que a RNA polimerase inicie a transcrição (CHEN *et al*., 2005). Se o flavonoide não induz NodD a dobrar o DNA da forma apropriada, não há ativação e consequentemente não há nodulação.

O espectro de flavonóides exsudados por uma leguminosa é um fator importante para a eficiência e determinante do número de diferentes espécies bacterianas que podem colonizar tal planta. Geralmente os NodD de rizóbios com ampla gama de hospedeiros respondem a uma diversidade de flavonóides maior do que os NodD presentes na bactéria com faixa de hospedeiros limitada (PERRET *et al*., 2000). *Sinorhizobium meliloti,* por exemplo, possui três proteínas NodD que respondem a diferentes grupos de flavonóides, sugerindo que a redundância de NodD promove respostas a uma ampla cadeia de flavonóides e permite que a bactéria infecte múltiplas hospedeiras (MACHADO,*et al*., 1998; LOH e STACEY, 2003). Também foi observado que a transferência do gene *nodD1* do promíscuo *Rhizobium* sp. NGR234 para outro rizóbio com uma faixa de hospedeiros menor, como *Sinorhizobiummeliloti*, amplia o espectro de plantas que o transconjugante reconhece como um parceiro simbiótico (BENDER *et al*., 1988).

3.2 GENES E FATORES DE NODULAÇÃO

Os genes de nodulação codificam proteínas responsáveis pela síntese e liberação dos fatores de nodulação (fatores Nod), que guiam o desenvolvimento nodular e permitem que a infecção prossiga, além de estarem envolvidos na determinação da especificidade do hospedeiro (CAPELA *et al*., 2005). A estrutura geral dos fatores Nod consiste em uma cadeia central de N-acetil-glucosamina (tetramérica ou pentamérica) com um radical acil na extremidade não redutora (ROCHE *et al.*, 1996).

Existe uma grande diversidade de genes de nodulação. Em *Azorhizobium, Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium loti*, os genes *nod* são encontrados no cromossomo bacteriano, mas na maioria dos demais rizóbios estes genes localizam-se em grandes plasmídeos simbióticos (pSym) (MERGAERT *et al*., 1997). Em *Rhizobium* sp. NGR234 apenas *nodE, nodG* e *nodPQ* são cromossômicos, enquanto os demais genes biossintéticos de fatores Nod estão no plasmídeo pNGR234a. Neste mesmo organismo, 14 dos 16 genes necessários para a produção de fatores Nod estão distribuídos entre cinco operons, cada um controlado por uma sequência

regulatória diferente (FREIBERG *et al*., 1997; KOBAYASHI *et al*., 2004). O operon *nodABCIJnolO*contém os genes *nodABC*, que codificam enzimas responsáveis pela síntese da estrutura básica dos fatores de nodulação, e os genes *nodIJ* que codificam as proteínas que estão envolvidas no transporte dos fatores Nod pela membrana interna da bactéria. Esses genes são muito comuns nos rizóbios e desempenham um papel de grande importância no processo de nodulação (WANG e STACEY, 1991; LONG, 1996; FREIBERG *et al*., 1997).

Em contraste, genes *nod* específicos, que estão envolvidos em várias modificações do esqueleto de quitina, conferem especificidade para a nodulação de um determinado hospedeiro (SNOECK *et al.*, 2001; WAIS *et al.,* 2002). Essas variações na estrutura dos fatores Nod podem surgir de várias fontes, como o comprimento da cadeia central (até seis resíduos de N-acetil-glucosamina), saturações e insaturações de ácidos graxos (*nodEF*), fucosilação (*nodZ, nolK, noeC*), sulfatação (*nodH e noeE*) ou acetilação (*nodL, nodX, nolL*) da estrutura básica (DÉNARIÉ *et al*., 1992; LONG, 1996; MERGAERT *et al*., 1997; D'HAEZE *et al*., 2002). Todas essas modificações e a diversidade das estruturas dos fatores Nod produzidas pelos rizóbios resulta da presença combinada de genes espécie-específicos e da variação alélica dos genes de nodulação. Dessa forma, uma determinada espécie de rizóbio irá produzir uma mistura de fatores de nodulação (de 2 a 60 moléculas distintas) (PERRET *et al.,* 2000; LONG, 1996). Mutações nos genes *nod* específicos não impedem a nodulação, mas podem causar atrasos na formação ou redução do número de nódulos e diminuir a gama de hospedeiros (GÖTTFERT *et al*., 1990).

Após liberados os fatores Nod induzem uma série de respostas na planta, incluindo enrolamento do pêlo radicular, despolarização da membrana plasmática, oscilação de cálcio intracelular, alterações no citoesqueleto do pêlo radicular, formação do cordão de infecção nos pêlos da raiz, inibição do sistema de geração de espécies reativas de oxigênio, indução de genes das plantas, além de funcionar como um mitógeno que induz o início da divisão celular no córtex da raiz e modifica o equilíbrio hormonal da planta provocando a formação de um primórdio, que no final dá origem a tecidos de nódulos maduros (GAGE, 2004; D'HAEZE e HOLSTERS, 2002). Ao se enrolar, o pêlo da raiz envolve os rizóbios presentes na rizosfera, aprisionando-os em seu tecido. Estes microssimbiontes invadem a raíz através do cordão de infecção e são depositados no citoplasma de células do córtex radicular,

onde se diferenciam em bacteroides capazes de fixar nitrogênio (DEAKIN e BROUGHTON, 2009; GAGE, 2004).

Além dos fatores Nod, outros produtos de rizóbios parecem ser necessários para o desenvolvimento contínuo do cordão de infecção. Entre eles estão polissacarídeos extracelulares (EPS) também denominados exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e β-glicanos cíclicos, bem como proteínas exportadas pelo sistema de secreção do tipo três (TTSS) (BROUGHTON *et al*., 2000).

O sistema de secreção tipo III (TTSS) está presente em diversas bactérias gram-negativas que causam doenças em plantas e animais, sendo utilizado para secretar proteínas de virulência no citoplasma da célula hospedeira. A maquinaria do TTSS é codificada a partir de um *cluster* de genes *hrp* (resposta hipersensitiva e patogênese) ou *hrc* (*hrp* conservado) originalmente identificado em fitopatógenos (HUECK, 1998; ALFANO e COLLMER, 1997). Em NGR234 foram encontrados homólogos dos genes *hrc* e renomeados para *rhc* (*Rhizobium* conservado) com o objetivo de distinguir claramente entre os componentes de TTSS de bactérias fitopatogênicas e rizóbios(FREIBERG *et al*., 1997; VIPREY *et al*., 1998). Funcionalmente, o TTSS de rizóbios também é muito semelhante ao de patógenos. O TTSS é composto por múltiplas subunidades proteicas que formam uma estrutura em forma de seringa que é capaz de injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células alvo eucarióticas (HUECK, 1998).

Em NGR234, no mínimo 20 genes estão envolvidos na expressão do TTSS, sendo secretadas pelo menos nove Nops, classificadas em dois grupos: proteínas que são componentes externos da maquinaria e proteínas efetoras que são ejetadas no citoplasma do hospedeiro (MARIE *et al*., 2003; AUSMEES *et al*., 2004; DEAKIN *et al*., 2005; SAAD *et al*., 2005; BARTSEV *et al*., 2004; SKORPIL *et al*., 2005). As proteínas transportadoras NopA, NopB e NopC fazem parte dos componentes extracelulares, estando associadas aos aparatos de superfície celular (KRISHNAN *et al*., 2003; DEAKIN *et al*., 2005; SAAD *et al*., 2005). NopJ, NopT, NopM, NopL e NopP são proteínas efetoras, que provavelmente são injetadas no citoplasma de células hospedeiras (BARTSEV *et al*., 2003; MARIE *et al*., 2003; AUSMEES *et al*., 2004; SKORPIL *et al*., 2005). O gene *rhcN* codifica umaproteína que possui características de ATPase, a qual pode funcionar provendo energia ao processo de secreção. Mutações em *rhcN* ou de genes que codificam componentes externos da

maquinaria do sistema de secreção tipo III geralmente bloqueiam a secreção de proteínas Nop e podem afetar a capacidade de nodular plantas hospedeiras.

A expressão dos genes codificadores do TTSS é dependente de flavonoides e NodD1 (KRISHNAN e PUEPPKE, 1993; KOBAYASHI *et al*., 2004; MARIE *et al*., 2003; PERRET *et al*., 1999; VIPREY *et al*., 1998). No entanto, a ausência de uma sequência *nod-box* na região regulatória dos operons *rhc* indicam que a regulação transcricional dos genes do TTSS é mediada por outro fator (VIPREY *et al*., 1998). A comparação entre as regiões promotoras de genes do TTSS permitiu a identificação de um provável elemento regulatório comum, que foi denominado *tts-box* (KRAUSE *et al*., 2002; MARIE *et al*., 2004). Estas sequências são reconhecidas pelo ativador transcricional TtsI (KRAUSE *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al*., 2004; MARIE *et al*., 2004; WASSEM *et al.,* 2008), que em NGR234 é dependente de NodD1 e flavonoides. TtsI contém dois domínios, sendo um domínio N-terminal e outro C-terminal helice-volta-helice (HTH), característicos dos sistemas de regulação de dois componentes (KRAUSE *et al*., 2002; MARIE *et al*., 2004). Outros rizóbioscomo *Sinorhizobiumfredii* estirpe USDA257 e HH103 também possuem TTSS e secretam Nops de maneira semelhante a NGR234 (KRISHNAN, 2002; KRISHNAN *et al*., 2003; LORIO *et al*., 2004).

3.3 REGULAÇÃO DOS GENES DE NODULAÇÃO

A proteína regulatória dos genes *nod* pertence a família LysR de reguladores transcricionais e é conhecida como NodD. Os membros dessa família são considerados reguladores transcricionais globais, atuando como ativadores ou repressores de genes únicos ou operons, e apresentam características conservadas, tais como: presença de um motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice em sua ponta N-terminal, que é responsável pelo reconhecimento do sítio específico na região promotora, e um domínio para ligação do co-indutor, que sinaliza uma condição fisiológica, na ponta C-terminal (MADDOCKS e OYSTON, 2008; SCHELL, 1993). Nos rizóbios, a proteína NodD é induzida por flavonoides específicos, que são liberados pelo hospedeiro correlato, à ativar a transcrição dos genes alvo, culminando na síntese dos fatores Nod (LONG, 1996). A ação desses ativadores ocorre através da sua ligação à sequências altamente conservadas do DNA (*nod-box*) encontradas nas regiões promotoras dos *locinod* (BARNETT *et al*., 2001;

SWANSON *et al*., 1993). As proteínas NodD são capazes de se ligar aos *nod-box* mesmo na ausência de um indutor, mas a expressão gênica só ocorre na presença de flavonoides (PERRET *et al.*, 2000).

Normalmente, *nod-box* são elementos reguladores raros, quase exclusivamente dedicados ao controle de operons envolvidos na síntese de fatores Nod (KANEKO *et al*., 2000; BARNETT *et al*., 2001). *Rhizobium* sp. NGR234 possui 19 elementos *nod-box* bem conservados (FREIBERG *et al*., 1997), sendo todos eles funcionais (KOBAYASHI *et al*., 2004). Este é um número elevado quando comparado com outros rizóbios, tais como *Bradyrhizobiumjaponicum* USDA110 e *Sinorhizobiummeliloti* 1021, que possuem de 7 a 9 *nod-box* cada (KANEKO *et al*., 2000), ou com *R. etli* CFN42 que apresenta 15 supostos *nod-box*, mas apenas sete desses parecem ser funcionais (GONZÁLEZ *et al*., 2003). A razão para tantos *nod-box* funcionais em pNGR234 não é totalmente compreendida. Sabe-se que apenas cinco dessas sequências estão envolvidas no controle da transcrição de genes *nod* (FREIBERG *et al*., 1997;. PERRET *et al*., 1999), enquanto os outros 13 regulam outras funções além da biossíntese de fatores Nod (KOBAYASHI *et al*., 2004; THEUNIS *et al*., 2004), como a produção de polissacarídeos ricos em ramnose, ou a transcrição de outros reguladores, como *syrM2* e *ttsI*. É provável que a variação das sequências *nod-boxes* esteja relacionada a um ajuste fino da transcrição dos genes de nodulação, de forma que algumas dessas sequências possuem afinidade mais elevada a determinados complexos NodD1-indutor do que outros (BROUGHTON *et al.*, 2000).

Os genes *nodD* são constitutivamente expressos e estão presentes em todos os rizóbios, podendo variar entre uma e cinco cópias dependendo da espécie (FISHER e LONG, 1993; FELLAY *et al*., 1998). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, por exemplo, tem apenas um gene *nodD* (*nodD2*), que quando inativado torna a estirpe incapaz de nodular. Em NGR234, a simples inativação de *nodD1* já é suficiente para torná-lo incapaz de realizar a nodulação, apesar de ainda possuir um gene *nodD2* funcional (RÉLIC *et al*., 1993; BROUGHTON *et al*., 2000). Em contraste, *Sinorhizobiummeliloti* possui três homólogos de NodD (NodD1, NodD2 e NodD3) que atuam como ativadores, sendo necessária a mutação de todos os três *loci* para impedir a nodulação. A importância de apresentar várias cópias de *nodD* ainda não foi esclarecida, mas alguns autores indicam que esse fator possibilita reconhecimento e resposta a uma maior quantidade de componentes da planta

durante simbiose com várias hospedeiras (GYORGYPAL *et al*., 1988).

Além de terem sua expressão induzida, os genes *nod* também estão sujeitos a regulação negativa (LOH e STACEY, 2003). Isso é muito importante porque níveis persistentes e elevados de fatores Nod podem provocar resposta de defesa na planta, interrompendo o processo de infecção ou resultando em nodulação defeituosa (KNIGHT *et al*, 1986). Em *Sinorhizobiummeliloti,* um repressor da família ArsR, chamado NolR, regula negativamente a transcrição dos genes *nodD1*, *nodD2*, e os genes *nodABC* (necessários para a síntese do núcleo central dos fatores Nod) (KONDOROSI *etal.,* 1991). Já em *Bradyrhizobium japonicum,* NolA e NodD2 são dois componentes chave na regulação negativa de genes *nod*. A proteína NolA (um regulador do tipo MerR) aumenta a expressão de *nodD2* e o produto deste, por sua vez, leva à repressão de genes de nodulação (LOH e STACEY, 2003). Segundo Loh e colaboradores (1999), mutantes de *nolA* em *Bradyrhizobiumjaponicum* e de *nolR* em *Sinorhizobiummeliloti* mantém a capacidade de nodular, mas com menor eficiência, sugerindo que um fino ajuste da expressão dos genes *nod* é necessário para a nodulação ideal.

Embora NodD seja o ativador central na regulação dos genes *nod*, para que uma nodulação eficiente ocorra, outros reguladores também estão envolvidos. *Sinorhizobiummeliloti,* por exemplo, possui um segundo tipo de regulador simbiótico (SyrM) que, assim como NodD, também pertence a família LysR e que regula a expressão de genes *nod* através de um circuito de ativação de transcrição envolvendo NodD3 (LOH e STACEY, 2003; SWANSON *et al*., 1993). Nessa cascata regulatória a expressão de *nodD3* é controlada positivamente por *syrM*, que por sua vez é positivamente regulado por *nodD3* e pelo próprio *syrM*, formando um circuito de auto regulação (MULLIGAN e LONG, 1989; KONDOROSI *et al*, 1991; SWANSON *et al*., 1993; BARNETT *et al*., 1996). Embora não tenha sido observado em outras estirpes de rizóbio, esse circuito regulatório pode ser importante para expressão de genes *nod* durante o desenvolvimento do nódulo, uma vez que *syrM* parece ser expresso em estágios intermediários de desenvolvimento (SHARMA e SIGNER 1990; SWANSON *et al*., 1993).

Em *Sinorhizobiummeliloti* foi encontrada uma classe especial de sinais moleculares, que não estão presentes em nenhuma outra espécie de rizóbio: fatores Nod contendo ácidos graxos hidroxilados. Os reguladores NodD3 e SyrM são os responsáveis pela indução dos genes envolvidos na síntese dessas moléculas. No

entanto, diferente do que ocorre na regulação dos demais fatores Nod onde uma ação conjunta de NodD3 e SyrM é essencial, os fatores Nod com ácidos graxos hidroxilados podem ter sua síntese induzida independentemente por NodD3 ou por SyrM (DEMONT *et al*., 1994).

Outra função de SyrM, também observada em *Sinorhizobiummeliloti,* é o aumento da expressão de *syrA.* (BARNETT *et al.* 1998). Dusha e colaboradores (1989) demonstraram que SyrM, na presença de flavonoide luteolina e disponibilidade de nitrogênio fixado, também está envolvido na determinação da proporção de EPS I de baixa massa molecular com relação aos EPS I de alta massa molecular. Juntos, SyrM e SyrA podem induzir genes *exo* (KEATING *et al.,* 2007) necessários para a invasão das raízes das plantas, e assim podem desempenhar um papel chave no sistema regulatório que coordena várias funções simbióticas (MULLIGAN e LONG, 1989; BARNETT *et al.* 1998). A região promotora de *syrA* e *nodD3* são similares e possuem sequências conservadas importantes para o controle por SyrM (BARNETT *et al*., 1996; BARNETT *et al.*, 1997).

Além de induzir a expressão de genes *exo*, SyrA também aumenta a transcrição do gene *lpsS,* que codifica a enzima LPS sulfotransferase (BARNETT, 2004; CRONAN E KEATING 2004; KEATING *et al*., 2007). Entretanto, tal indução não necessariamente leva a um aumento na quantidade de lipopolissacarídeos sulfatados (KEATING *et al.* 2007). Para que a sulfatação de LPS ocorra, além da indução de *lpsS,* é necessária a ativação dos genes *nodPQ*(SCHWEDOCK e LONG, 1990; SCHWEDOCK et al., 1994; SCHWEDOCK E LONG, 1992) que codificam enzimas necessárias para biosíntese do doador de sulfato ativado (PAPS) (BARNETT, *et al*., 2004; MULLIGAN e LONG, 1989). A transcrição de *nodPQ* (uma das duas cópias presentes no genoma) de *Sinorhizobiummeliloti* é ativada por NodD3. Assim, é esperado que na planta a transcrição de *syrA* culmine no aumento da atividade de LpsS, elevada quantidade de PAPS intracellular e maior sulfatação de LPS (KEATING *et al*., 2007). Estirpe mutante no gene *lpsS* exibe simbiose alterada com alfafa, produzindo maior número de nódulos que a estipe selvagem. No entanto, em condições de vida livre o mutante *lpsS* não apresenta nenhuma diferença na sulfatação de LPS (CRONAN e KEATING, 2004). Esses dados sugerem que a expressão de *lpsS* é diferencialmente regulada, sendo reprimida em condições de vida livre e ativada apenas durante simbiose. Um fator importante na regulação dos genes *lpsS* e *exo* é o fato de SyrA agir indiretamente, através de um

mecanismo que requer o sistema de dois componentes ExoS/ChvI (KEATING *et al.,* 2007).

Várias observações indicam que *syrM* pode realizar diferentes funções na planta e em condições de vida livre. Como *nodD3* não é expresso nos bacteroides (nos nódulos), o papel simbiótico de *syrM* na planta provavelmente não seja a ativação de *nodD3*. Da mesma forma, *syrM* não é necessário para expressão de *syrA* em nódulos maduros, mas apenas em condições de vida livre. No entanto, a atividade de *syrM*pode ser importante para expressão de genes *nod* durante o desenvolvimento do nódulo (SHARMA e SIGNER 1990; SWANSON *et al*., 1993). Barnett e colaboradores (1998) observaram que a expressão de *syrM* é mantida a níveis baixos em condições de vida livre, através de repressão por uma proteína de 16,5 kDa chamada SyrB.

Embora SyrM seja vista como uma proteína regulatória global, que influencia a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de fatores Nod, produção de exopolissacarídeos e sulfatação de lipopolissacarídeos, o circuito que envolve SyrM, NodD3 e SyrA não foi observado em outras espécies de rizóbios e portanto é provável que esteja envolvido na simbiose de maneira específica aos hospedeiros de *Sinorhizobiummeliloti*(SHARMA e SIGNER 1990; SWANSON *et al*., 1993).

A superexpressão de *syrM*, *nodD3* e *syrA* permite que ocorra simbiose entre *Sinorhizobiummeliloti* e *Macroptilium atropurpureum*, mas o mecanismo que torna a nodulação possível ainda não é conhecido (KONDOROSI *et al.,* 1991). *Medicago truncatula* inoculada com a estirpe de *Sinorhizobiummeliloti* mutante em *syrM* apresenta apenas a formação de primórdios que não são capazes de se desenvolver em nódulos. Isso sugere que SyrM é essencial para continuar o desenvolvimento do nódulo, mas não para iniciar a nodulação. Em alfafa (*Medicago sativa*) inoculada com o mesmo mutante, a nodulação ocorre, embora seja mais lenta (SWANSON *et al.,* 1993;MULLIGAN e LONG 1989; KONDOROSI *et al.,* 1991; BARNETT *et al*., 1997). Isso indica que SyrM é necessária para uma nodulação eficiente e que provavelmente haja especificidade do hospedeiro para a presença desse ativador transcricional. Talvez SyrMtambém interaja com genes de nodulação específicos que são mais importantes para nodulação em *Medicagotruncatula* do que em alfafa (SMITH e LONG, 1998).

Em NGR234 existem duas cópias de *syrM*, *syrM*1 e *syrM*2, localizadas no plasmídeo simbiótico pNGR234*a* (FREIBERG *et al.,* 1997), cuja função ainda não é

completamente conhecida. Sabe-se que SyrM2 é necessária para a expressão de *nodD*2 (KOBAYASHI *et al*., 2004), e que SyrM1 está envolvida na ativação de vários genes do plasmídeo simbiótico e no controle do nível de fatores Nod sulfatados (HANIN *et al.,* 1998).

Além das duas cópias de *syrM*, NGR234 possui duas cópias de *nodD*, *nodD1* e *nodD2*, que junto com outros reguladores tornam a expressão dos genes *nod* fortemente regulada. A ação coordenada de NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2, além de TtsI dirige a expressão de pelo menos 75 genes envolvidos na nodulação e na fixação de nitrogênio (KOBAYASHI *et al*., 2004).

NodD1 é o ativador chave dos *loci* cuja expressão é dependente de flavonoides (RELIC *et al*., 1993). Isso é confirmado pelo fenótipo de rizóbios mutantes no gene *nodD1,* que são incapazes de nodular qualquer planta, devido a falta do ativador responsável pela transcrição dos genes *nodABC*, entre outros genes essenciais para a nodulação (FELLAY *et al*. 1995).

Dentre os genes controlados por NodD1 está o gene *nodD2,* que, mesmo sem possuir nenhuma sequencia *nod-box* em seu promotor, é dependente de NodD1. Ao invés de um *nod-box*, foi encontrado um possível sítio para ligação de SyrM a montante de *nodD2*, semelhante aos elementos encontrados nos promotores de *nodD3* e *syrA* de *Sinorhizobiummeliloti*. Kobayashi e colaboradores (2004) mostraram que o ativador de *nodD2* é SyrM2 e sugeriram que o sítio de ligação de SyrM2 é o *syrM-box* identificado. Uma vez que *syrM2* é dependente de NodD1, já que possui o *nod-box* 19 em sua região promotora, a ordem de regulação é: NodD1 ativa *syrM2*, cujo produto ativa *nodD2*.

Várias análises demonstraram que NodD2 está envolvido na repressão de *nodD1* (MACHADO *et al*., 1998; FELLAY *et al*., 1998; PINHEIRO, 2009). Kobayashi e colaboradores (2004) sugerem que uma repressão significativa de *nodD1* é observada aproximadamente 24 horas após a indução por flavonoides e que exige tanto NodD2 como o próprio NodD1. O mecanismo exato dessa repressão ainda é desconhecido em NGR234, mas possivelmente ele se assemelha ao processo descrito para *Rhizobiumleguminosarum* bv. *viciae*, onde ocorre uma competição entre NodD e a RNA polimerase pelo sítio de ligação (HU *et al*., 2000). Além de reprimir *nodD1*, NodD2 também é responsável pela repressão tardia de vários genes da biossíntese de fatores Nod, incluindo os genes *nodABC*. No entanto ainda não está claro se a repressão desses genes de nodulação é diretamente mediada por

NodD2 ou é uma consequência da repressão de *nodD1*. A expressão tardia de NodD2 que causa a repressão tardia de seus alvos, caracteriza uma regulação temporal (KOBAYASHI *et al*., 2004) necessária para a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em raízes de *Vigna unguiculata* e outros hospedeiros de NGR234 (FELLAY *et al*. 1998).

O produto de *nodD2* também parece atuar na indução dos genes *fixF*, *y4wE* e *y4wM*, embora a interação direta de NodD2 ao *nod-box* desses genes ainda não tenha sido demonstrada. Um desses genes, *fixF,* está envolvido na síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose que são necessários para as fases finais da interação simbiótica (BROUGHTON *et al.,* 2006).

Os genes *syrM1* e *syrM2* de NGR234 são muito semelhantes aos genes *syrM* de *Sinorhizobiummeliloti* (BARNETT e LONG 1990) e *Rhizobiumleguminosarum* bv. *phaseoli* (MICHIELS *et al*. 1993). Segundo Hanin e colaboradores (1998), em *Rhizobium* sp. NGR234, *syrM1* codifica um ativador transcricional que regula a expressão de genes envolvidos tanto nas etapas iniciais quanto finais da simbiose. Os mesmos autores descrevem que os níveis de expressão de *syrM1* são extremamente baixos, de forma semelhante ao observado em *Sinorhizobiummeliloti* (SHARMA e SINGER, 1990). Pinheiro (2009) confirmou tais resultados e sugeriu expressão constitutiva desse regulador, enquanto *nodD1*, *nodD2, syrM2* e *ttsI* sofrem regulação por flavonoides e NodD1.

Entre os genes potencialmente ativados por SyrM1 estão os genes *nodPQ,* que ajudam a controlar o nível de fatores Nod sulfatados (HANIN *et al*., 1998), e os genes *nopB* e *rhcC1* (anteriormente chamados de *nolB* e *nolW*) componentes do sistema TTSS (FELLAY *et al*. 1995; HANIN *et al*., 1998). Mutantes *syrM1* de NGR234 produzem muito menos fatores Nod sulfatados que a bactéria do tipo selvagem (HANIN *et al*., 1998). Em*Sinorhizobium meliloti*, NodPQ são necessários para a síntese de PAPS, o doador ativado de sulfato (POUPOT *et al*. 1995). Isto sugere que a diminuição nos fatores Nod sulfatados pode ser devido a uma diminuição no conjunto de PAPS disponíveis para a síntese de fatores Nod e aponta para o baixo nível de expressão de *nodPQ* como a causa de tal fenótipo (HANIN *et al*., 1998). Estes autores sugeriram que uma das duas cópias dos genes *nodPQ* é ativada por SyrM1. O efeito de inativação do gene *syrM1* de NGR234 sobre a nodulação também foi avaliado por Hanin e colaboradores (1998), que notaram apenas diferenças discretas no perfil de nodulação em diversas plantas hospedeiras.

Estes dados sugerem que o papel de SyrM1 é o de otimizar a expressão dos fatores de nodulação e o reconhecimento específico entre os parceiros simbióticos, mas que não tem função essencial na nodulação.

Segundo Kobayashi e colaboradores (2004), *syrM2* está sob o controle de um *nod-box*, faz parte de uma cascata de regulação que inclui NodD1 e NodD2, e controla vários loci que são tardiamente induzidos por flavonoides. Ele também propõe que a transcrição de *nodD2* é desencadeada pela ligação de SyrM2 ao elemento *syrM-box* encontrado na região promotora de *nodD2*. Estes mesmos autores observaram apenas níveis basais de expressão de *syrM2* logo após a indução por flavonoides e uma ativação significativa do promotor *nodD2* só depois de seis horas da indução. Isso sugere que a ativação plena da cascata regulatória NodD1-SyrM2-NodD2 requer tempo, pois é preciso ter um número suficiente de moléculas de SyrM2 para permitir a plena expressão de *nodD2.* Alem disso, outro suposto sítio de ligação para SyrM2 foi encontrado na região regulatória do gene *y4xD* de função desconhecida (KOBAYASHI *et al*., 2004).

Uma cascata regulatória que conduz à ativação dos loci dependentes de flavonoides foi proposta por Kobayashi e seus colaboradores, em 2004 (Figura 1). A ativação de cada um dos passos dessa cascata não ocorre simultaneamente, promovendo uma regulação temporal que parece ser essencial para o desencadeamento de cada uma das etapas do estabelecimento da simbiose. De acordo com este modelo, os flavonóides compatíveis interagem com NodD1, formando um complexo que em poucos minutos ativa os operons responsáveis pela síntese e liberação dos fatores Nod. Esse diálogo molecular permite que NGR234 inicie a nodulação. Algumas horas mais tarde, NodD1 ativa a expressão de *ttsI* que age como intermediário na transcrição dos genes codificadores do sistema TTSS. Finalmente, cerca de 24 horas após a indução por flavonoides, a transcrição de *syrM2* atinge nível máximo, ativado por NodD1. SyrM2, por sua vez, ativa a transcrição de *nodD2*, e o produto deste gene induz alguns *loci*, como o *fixF*, que está envolvido na síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose. Concomitantemente, NodD2 reprime a expressão de *nodD1*. Complementarmente, a pesquisa de Pinheiro (2009) demonstrou que SyrM1 reprime a expressão de *ttsI* na ausência de flavonoides, enquanto na presença de flavonóides NodD2 exerce tal efeito repressor. Desta forma, a expressão de um gene simbiótico é programada para coincidir com a exigência de sua contribuição para um determinado estágio de

infecção da raiz ou de desenvolvimento dos nódulos (COOPER *et al*., 2007).

.

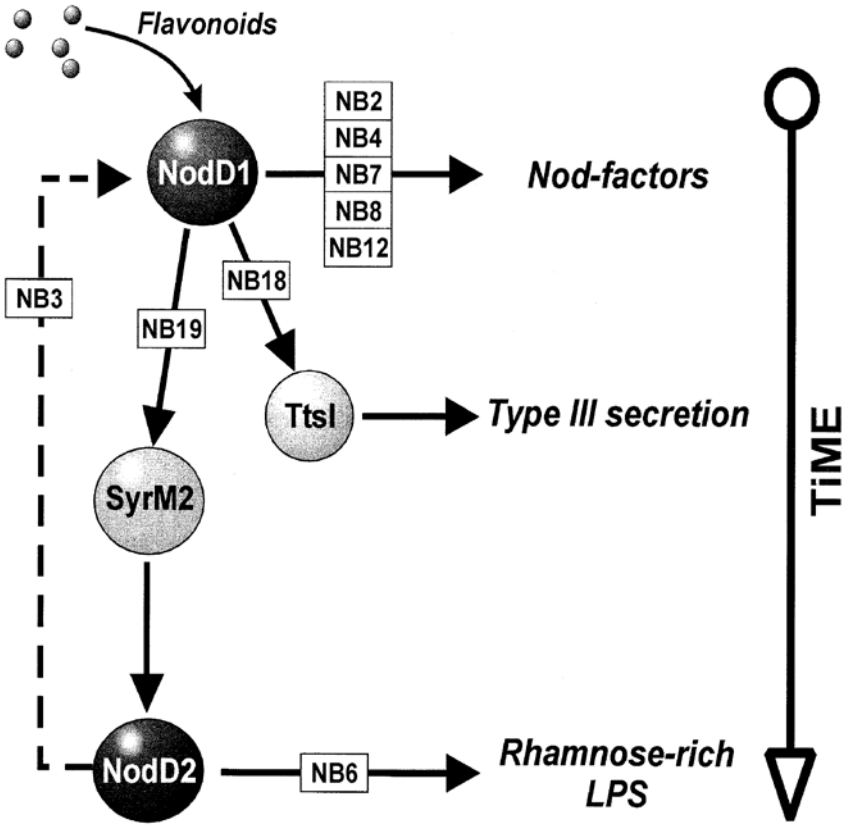


FIGURA 1 - MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONOIDES EM *Rhizobium* sp. NGR234. As linhas contínuas indicam uma atividade indutora. As linhas tracejadas indicam uma atividade repressora. NB=*nod-box.*FONTE: KOBAYASHI *et al.* (2004).

4. ARTIGO

Efeito de SyrM1 e SyrM2 na cascata regulatória de nodulação em *Rhizobium* sp. NGR234

SENA, J.; BONATTO, A.C. eWASSEM, R.

Laboratório de Interação Planta-Bactéria, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

RESUMO

A expressão de genes envolvidos na nodulação e fixação de nitrogênio em *Rhizobium* sp. NGR234 é controlada por uma complexa cascata regulatória que envolve o regulador chave NodD1 e outros ativadores transcricionais, tais como NodD2 e SyrM2. Além disso, outros reguladores também podem ser componentes da cascata, tais como SyrM1 e NodVW, mas suas funções ainda não foram definidas. No presente trabalho, foram construídas estirpes mutantes nos genes *syrM1* e *syrM2*, além de uma estirpe duplo mutante *syrM1*/*syrM2*. A análise da expressão de potenciais genes alvo mostrou que SyrM2 pode estar diretamente envolvido na ativação de *y4xD* e *nodD2* e é capaz de aumentar indiretamente a expressão de *nopB.* Ensaios de EMSA (ensaio de alteração da mobilidade eletroforética) confirmaram que SyrM2 reconhece e interage fisicamente com a região regulatória de *y4xD* e *nodD2*. Além disso, SyrM1 pode desempenhar uma atividade repressora em *y4xD* e *nopB*, que atenua os níveis de expressão desses genes. Por outro lado, os genes *rhcC1* e *nodPQ* não são alvos de SyrM1 ou SyrM2 e não são regulados por flavonoides. Quando as estirpes mutantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de nodulação, foi possível observar que SyrM2 aumenta o número de nódulos nas raízes de *Phaseolus vulgaris* e diminui a nodulação em *Tephrosia vogelii e Macroptilium atropurpureum*. Em *Phaseolusvulgaris* e*Tephrosiavogelii* é provável que ocorra uma complementação das atividades de SyrM1 e SyrM2 que é hospedeiro-específica.A nodulação em *Vigna unguiculata* não é afetada pelos ativadores SyrM1 e/ou SyrM2.

Palavras-chave: *Rhizobium* sp. NGR234, nodulação, *syrM1* e *syrM2*.

INTRODUÇÃO

Diversas bactérias de vida livre do solo são capazes de estabelecer uma relação simbiótica com plantas leguminosas da família Fabaceae e realizar o importante processo de fixação biológica do nitrogênio. Entre esses microorganismos encontra-se o*Rhizobium* sp. NGR234, um bacilo gram-negativo pertencente à família Rhizobiaceae (TRINICK, 1980), que tem a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com 112 gêneros da família Fabaceae, além de uma planta não leguminosa, *Parasponia andersonii*, sendo considerado um simbionte promíscuo em comparação com outros rizóbios (PUEPPKE e BROUGHTON,1999).Assim como em outros rizóbios, as proteínas regulatórias NodD determinam o controle inicial da interação simbiótica entre NGR234 e suas plantas hospedeiras, através da ativação da expressão de genes de nodulação (genes *nod*) induzidos por sinais moleculares específicos da planta, os flavonoides (BROUGHTON *et al*., 2000). Os genes *nod* codificam proteínas responsáveis pela síntese e liberação dos fatores de nodulação (fatores Nod), que guiam o desenvolvimento nodular e permitem que a infecção prossiga, além de estarem envolvidos na determinação da especificidade do hospedeiro. Além dos fatores Nod, outros produtos de rizóbios parecem ser necessários para o desenvolvimento contínuo do cordão de infecção. Entre eles estão polissacarídeos extracelulares (EPS) também denominados exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e β-glicanos cíclicos, bem como proteínas exportadas pelo sistema de secreção do tipo três (TTSS) (BROUGHTON *et al*., 2006; SOTO *et al*., 2006; JONES *et al*., 2007).

Os reguladores simbióticos SyrM são homólogos às proteínas NodD e pertencem a mesma família de ativadores transcricionais (LysR). Em *Sinorhizobium meliloti*, SyrM é vista como uma proteína regulatória global, que influencia a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de fatores Nod, produção de exopolissacarídeos e sulfatação de lipopolissacarídeos. Em NGR234 existem duas cópias de *syrM* (*syrM1* e *syrM2*), localizadas no plasmídeo simbiótico pNGR234*a* (FREIBERG *et al*., 1997), que são muito similares aos genes *syrM* de *Sinorhizobiummeliloti* (BARNETT e LONG 1990). A Inativação de *syrM1* leva à uma diminuição na sulfatação de fatores Nod, mas não altera significativamente a

capacidade de nodulação de diversas plantas hospedeiras. Além disso, SyrM1 parece estar envolvida na ativação de genes importantes para a simbiose, tais como *nopB, rhcC1* e *nodPQ* (HANIN *et al.,* 1998). Em *Sinorhizobiummeliloti*, as proteínas NodPQ são necessárias para a síntese de PAPS, o doador de sulfato ativado (POUPOT*et al*. 1995). Formalizado que SyrM1 regula *nodPQ*, a diminuição nos fatores Nod sulfatados observada pode ser devido a uma diminuição no conjunto de PAPS disponíveis para a sulfatação de fatores Nod. Sabe-se que RhcC1 faz parte do complexo transportador de proteínas efetoras do TTSS e está localizada na membrana externa (VIPREY *et al*., 1998). NopB, juntamente com NopA e NopC, fazem parte dos componentes extracelulares do sistema de secreção tipo III (TTSS) (KRISHNAN *et al*., 2003; DEAKIN *et al*., 2005; SAAD *et al*., 2005).A transcrição de *syrM*2, diferente de *syrM1*, está sob o controle de um *nod-box* e é necessária para a expressão de *nodD*2. Uma provável sequencia *syrM-box* foi encontrada na região promotora de *nodD*2 e do gene hipotético *y4xD*, sugerindo que pode existir um mecanismo regulatório de *y4xD,* dependente de SyrM, semelhante ao demonstrado para *nodD2* (KOBAYASHI *et al*., 2004).

Rhizobium sp. NGR234 possui uma complexa cascata regulatória que inclui os ativadores transcricionais NodD1, NodD2, SyrM1 e SyrM2, além de TtsI. Juntos esses reguladores dirigem a expressão de pelo menos 75 genes controlados por *nod, tts ou syrM-boxes*, modulando a expressão de genes envolvidos na nodulação e na fixação de nitrogênio (KOBAYASHI *et al*., 2004). Neste trabalho, foi analisada a função de SyrM1 e SyrM2 na regulação de potenciais genes alvo (*y4xD*, *nodD2*, *nodPQ*, *nopB* e *rhcC1*), bem como sua influência na nodulação de *Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris e Tephrosia vogelii.*Os dados obtidos confirmam que SyrM2 é um importante regulador da cascata de nodulação e que afeta tanto positiva quanto negativamente a nodulação de plantas hospedeiras. Além disso, os dados sugerem que SyrM1 tem apenas função secundária na cascata de nodulação, provavelmente atuando no ajuste fino da expressão gênica.

RESULTADOS

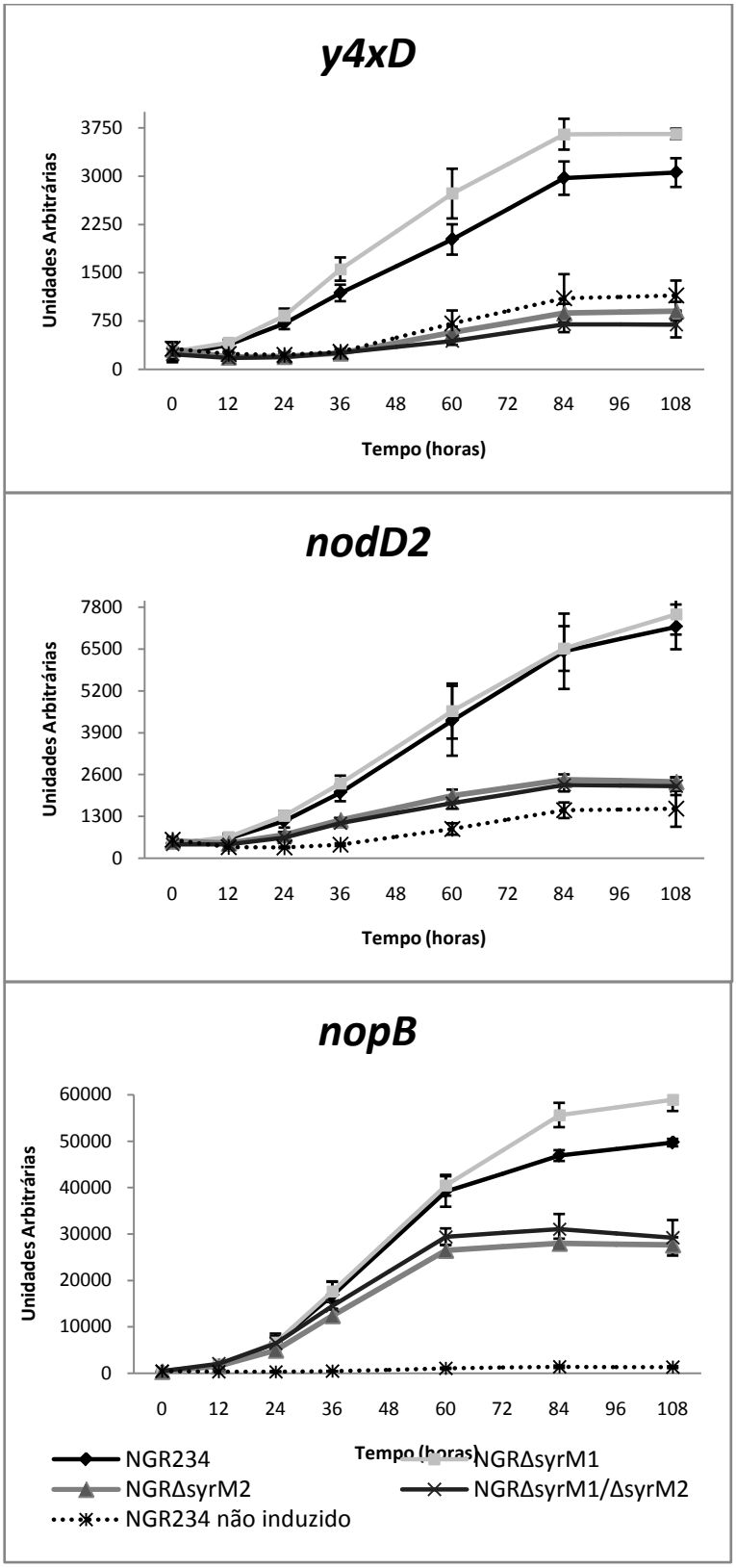
Função de SyrM1 e SyrM2 na regulação dos genes y4xD*,* nodD2*,* nopB*,* nodPQ *e* rhcC1

Para avaliar a influência dos ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2 na regulação dos genes candidatos *y4xD, nodD2, nopB, rhcC1* e *nodPQ*, as supostas regiões promotoras desses genes foram clonadas no vetor pPROBE-GT ou pPROBE-GT', fusionadas ao gene repórter *gfp* (proteína verde fluorescente; GFP). Tais construções foram introduzidas nas estirpes NGR234 selvagem, NGRΔ*syrM1*, NGRΔ*syrM2* e NGRΔ*syrM1*Δ*syrM2* e a expressão de GFP foi avaliada após a adição de uma mistura dos flavonoides apigenina, crisina, genisteína, kampferol e naringenina (10^{-6} M). A intensidade de fluorescência emitida pelos transconjugantes na presença e ausência de flavonoides foi mensurada nos intervalos de 0, 12, 24, 36, 60, 84 e 108 horas após a indução. O teste t de Student foi utilizado como método estatístico para comparar os resultados de expressão gênica, sendo considerado um valor de significância menor ou igual a 0,05.

Nas construções *y4xD, nodD2* e *nopB* foi observada baixa expressão na ausência de flavonoide e um aumento gradativo após a adição de flavonoides (figura 1). Este perfil é esperado, uma vez que estes genes estão envolvidos com o processo de nodulação, onde as principais moléculas ativadoras são flavonoides.

Logo nas primeiras 12 horas após a indução o teste estatístico evidenciou aumento significativo de expressão de *y4xD* nas estirpes NGR234 e NGRΔ*syrM1*, que aumentou gradativamente com o passar do tempo, enquanto nas estirpes NGRΔ*syrM2* e NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* sua expressão não foi induzida, permanecendo no mesmo nível que a estirpe NGR234 não induzida. Esses resultados sugerem que SyrM2 controla a expressão de *y4xD*, atuando como indutor desse gene, de maneira dependente de flavonoides. Também foi observado que a partir de 36 horas o nível de expressão de *y4xD* foi mais elevado na estirpe NGRΔ*syrM1* do que na estirpe selvagem. Esse efeito repressor de SyrM1 também foi observado em *nopB*, porém mais tarde, a partir de 60 horas. No entanto, SyrM1 parece agir apenas como um atenuador do nível de expressão desses genes, não sendo capaz de reprimir totalmente sua expressão. Com *nodD2* também foi possível observar, após 12 horas de indução, uma expressão significativamente maior nas estirpes NGR234 e NGRΔ*syrM1*que em NGRΔ*syrM2* e NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2.* Esse dado confirma que o ativador de *nodD2* é SyrM2, conforme demonstrado por Kobayashi e colaboradores (2004).No entanto, na presença de flavonoides, *nodD2*pareceu ser induzidomesmo na ausência de SyrM2, embora em níveis reduzidos (figura 1).

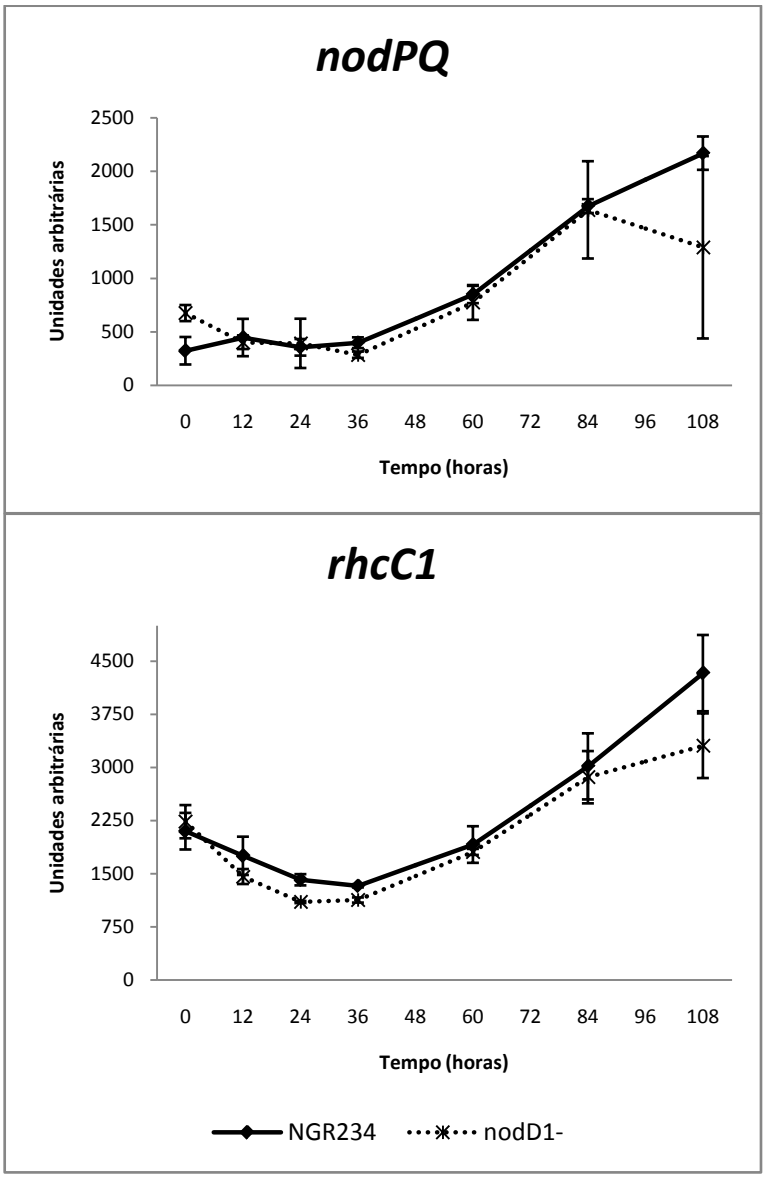
FIGURA 1– INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS DE*y4xD*, *nodD2* e *nopB*. Os gráficos representam a média e o desvio padrão de cinco repetições experimentais. O Teste t de Student foi utilizado como método estatístico para analisar o nível de significância dos resultados.



FONTE: O autor.

O promotor do gene*nopB* é forte (49702+/-802 unidades) se comparado com *y4xD* (3054+/-223 unidades) e *nodD2* (7188+/-695) e tardiamente induzido por SyrM2. Esse efeito ativador tardio é evidente a partir de 60 horas em NGRΔ*syrM2* e NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* onde sua expressão é menor que nas outras duas estirpes, embora esta não seja completamente abolida como acontece com *y4xD*. Semelhante ao que acontece com *y4xD,nopB* parece ser reprimido por SyrM1, uma vez que os níveis de expressão são menores na estirpe selvagem que na NGRΔ*syrM1* (figura 1). No entanto, este efeito repressor de SyrM1 em *nopB* foi observado após 60 horas após indução por flavonoide. Quanto a *nodPQ* e *rhcC1*, nenhum efeito de SyrM1 e SyrM2 foi observado. Para confirmar que não havia realmente nenhuma atividade tardia nesses promotores, um experimento prolongado, de até 252 horas após indução, foi realizado e nenhuma diferença foi observada(figura 6). Além disso, foi verificado que ao contrário do que ocorre com *nopB, y4xD* (este trabalho)e *nodD2* (KOBAYASHI *et al*., 2004), os genes *nodPQ* e *rhcC1* não são induzidos pelo principal regulador da cascata de nodulação de NGR234, NodD1 (figura 2).

FIGURA 2–INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS DE *nodPQ* e *rhcC1*. Os gráficos representam a média e o desvio padrão de três repetições experimentais. O Teste t foi utilizado como método estatístico para analisar o nível de significância dos resultados.



FONTE: O autor.

Ligação de SyrM1 e SyrM2 à região promotora de y4xD *e* nodD2

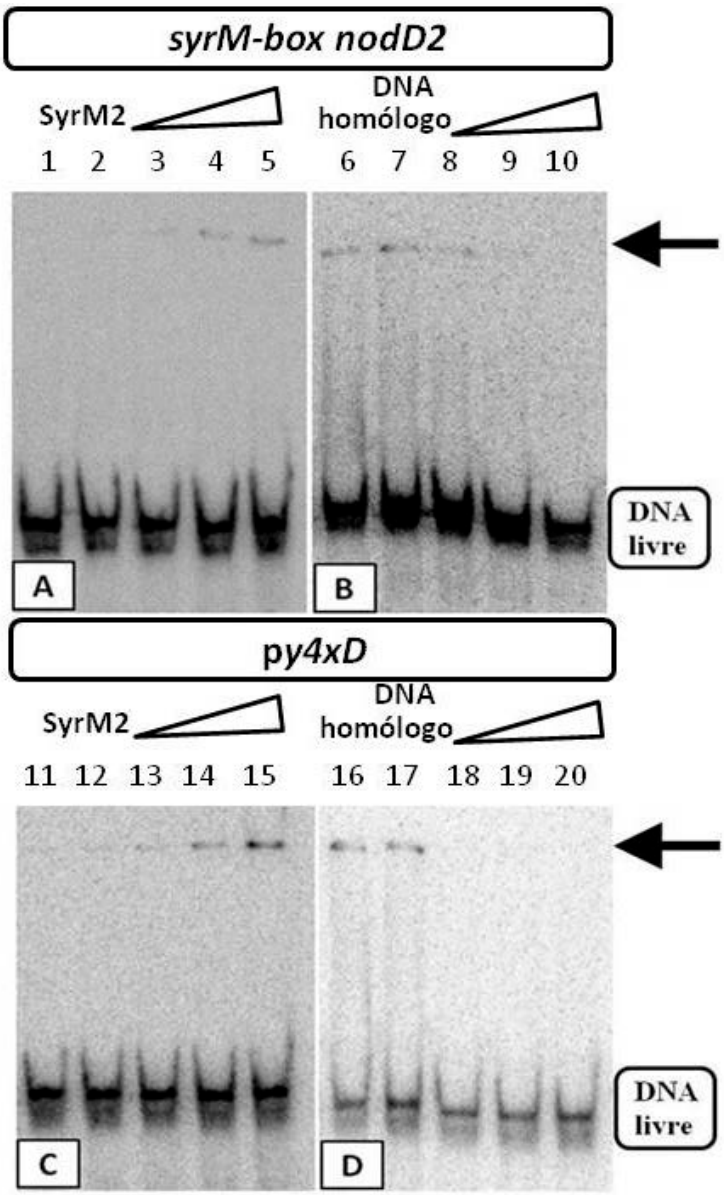
O Ensaio de Alteração da Mobilidade Eletroforética (EMSA) foi utilizado para testar a ligação dos reguladores SyrM1 e SyrM2 às possíveis regiões regulatórias dos genes alvo em estudo. As proteínas foram superexpressas fusionadas a uma cauda de histidinas e posteriormente purificadas por cromatografia de afinidade. As sequências gênicas contendo o *syr-box* localizado na região regulatória de *nodD2,* e *y4xD* foram marcadas radioativamente com ^{32}P e ensaiadas na presença dos reguladores SyrM1 e SyrM2.

O ativador transcricional SyrM2 foi capaz de interagir tanto com o *syr-box* de *nodD2* (Figura 3A) quanto de *y4xD* (Figura 3C). Além do DNA livre é possível visualizar no gel, a partir da concentração de 0,8µM de SyrM2, uma banda de menor mobilidade formada pelo complexo de ligação proteína-DNA. Para confirmar a especificidade dessa interação foram realizadas reações usando SyrM2 e DNA heterólogo (poli dIdC)como competidor, mas como esperado nenhuma interferência do competidor foi detectada (dados não mostrados). Também foi realizada uma curva com a concentração fixa de 1,3µM de SyrM2 e concentrações crescentes de DNA homólogo (mesmo fragmento de DNA, não marcado radioativamente). Nessa curva foi observada uma gradativa dissociação da interação proteína-DNA, confirmando que a banda mais lenta é resultante da ligação específica de SyrM2 à sequencia alvo (Figura 3B e 3D).

Quanto à SyrM1, não foi possível notar a interação de SyrM1 com nenhuma das sequências promotoras, nas condições testadas, mesmo utilizando mais de 3,5 µM de proteína.Uma possível ação conjunta de SyrM1 e SyrM2 foi testada realizando um EMSA com a concentração fixa de SyrM2 igual a 0,75 µM e concentrações crescentes de SyrM1, e outro com a concentração de SyrM1 fixa em aproximadamente 1,9 µM e concentrações crescentes de SyrM2, mas nenhuma interação de SyrM1 com o DNA alvo foi observada em nenhum dos casos (dados não mostrados). Finalmente, para testar se havia influência de flavonoides na interação de SyrM2 com as regiões promotoras de *y4xD* e *nodD2*, foi realizado um EMSA com 1,5µM de proteína na ausência e na presença de 10^{-6} M de um dos seguintes flavonoides: crisina, genisteína, kampferol e naringenina. Não foi observada diferença entre as reações testadas, demonstrando que os flavonoides não estão envolvidos na interação de SyrM2 com os *syrM-box* (dados não

mostrados).

FIGURA 3 - ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA COM SyrM2. A- Curva de concentração SyrM2 usando *syrM-box* de *nodD2* como alvo. B- Curva de DNA homólogo syrM-*box* de *nodD2*. C- Curva de concentração SyrM2 usando a região regulatória de *y4xD* como alvo. As linhas 1-5, assim como 11-15 representam concentrações proteicas de 0; 0,5; 0,8; 1,3 e 1,5 respectivamente. D- Curva de DNA homólogo p*y4xD*. As linhas 6 e 16 indicam reações apenas com DNA marcado, enquanto as linhas 7-10 e 17-20 representam reações contendo concentrações crescentes de DNA alvo não marcado com ^{32}P. As setas pretas apontam as bandas que representam o DNA alvo capturado pela proteína.



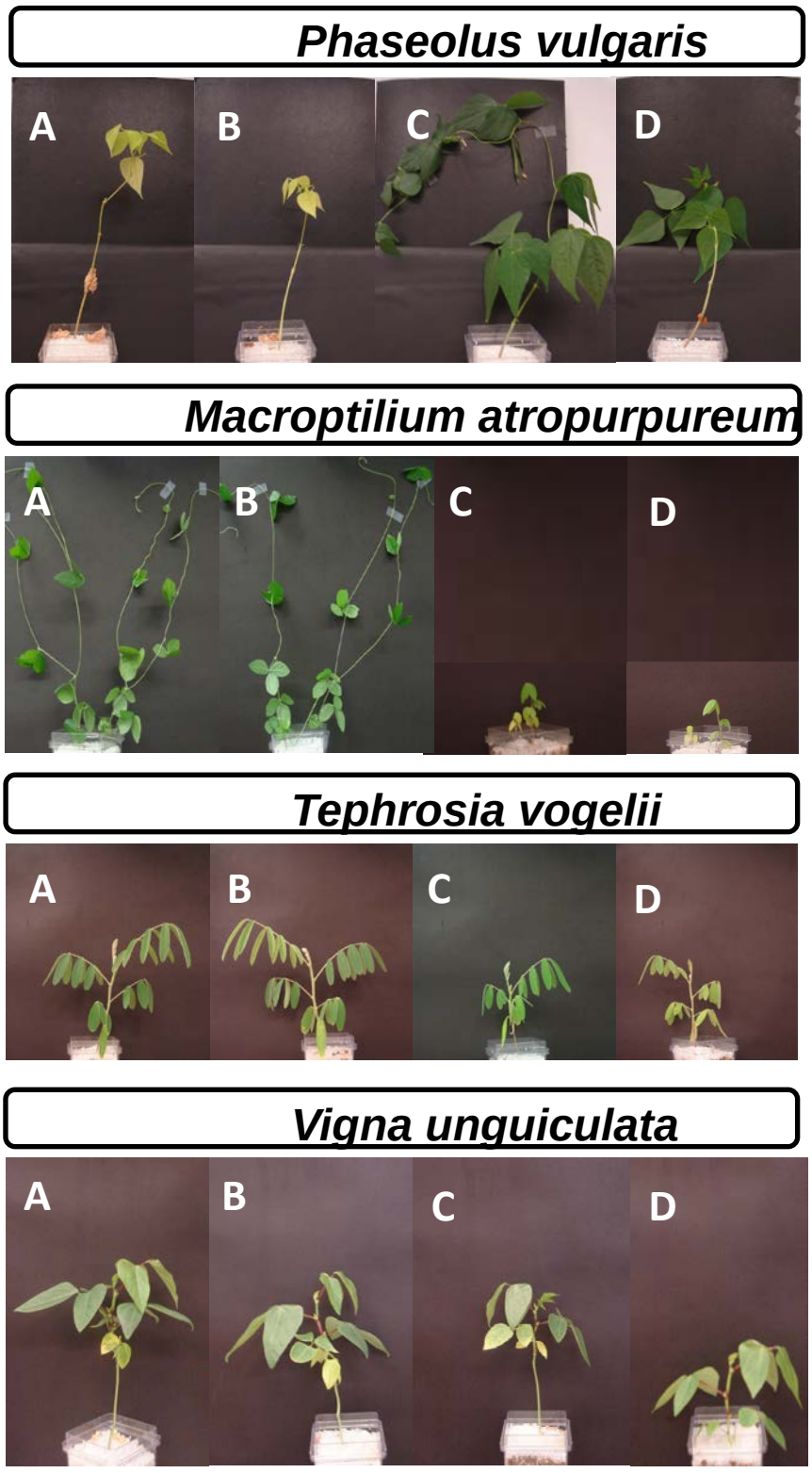
FONTE: O autor.

Efeito de SyrM1 e SyrM2 de NGR234 na simbiose

Para avaliar o efeito de SyrM1 e SyrM2 na simbiose, o fenótipo de nodulação de algumas leguminosas foi analisado. Para isso, as espécies *Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum, Tephrosia vogelii* e *Phaseolus vulgaris* foram inoculadas com as estirpes selvagem NGR234 e mutantes NGR∆*syrM1*, NGR∆*syrM2* e NGR∆*syrM1*∆*syrM2*. As plantas foram cultivadas à temperatura de 28°C com 14 horas de luz e após um período de tempo suficiente para a formação de nódulos maduros e funcionais, que variou de 6 a 8 semanas de acordo com a espécie de leguminosa, as plantas foram colhidas para a análise do fenótipo de nodulação. O número e a massa de nódulos maduros, bem como a massa fresca da parte aérea foram avaliados. O teste t de Student foi utilizado como método estatístico para comparar os resultados, sendo considerado um valor de significância menor ou igual a 0,05.

Em todas as plantas testadas a nodulação por NGR234 e NGRΔ*syrM1* foi similar, sugerindo que SyrM1 não afeta a simbiose nessas plantas. A nodulação por NGRΔ*syrM2* foi menos eficiente, com redução do número de nódulos em *Macroptilium atropurpureum* e*Tephrosia vogelii* e mais eficiente, com aumento significativo do número de nódulos em *Phaseolusvulgaris.* NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* mostrou fenótipo semelhante a NGRΔ*syrM2 em Macroptilium atropurpureum,* sugerindo que o fenótipo de NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* é devido a falta de SyrM2 e não de SyrM1. Em *Phaseolusvulgaris* e*Tephrosia vogelii* o mutante duplo NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* apresentou um fenótipo que sugere que os dois reguladores podem agir conjuntamente ou ter ação complementar.Em *Phaseolusvulgaris*, o mutante duplo para *syrM1* e *syrM2* apresentou um fenótipo intermediário entre aqueles observados em NGRΔ*syrM2* e NGR234. Já em *Tephrosia vogelii*as estirpes NGR234 e NGRΔ*syrM1* apresentaram fenótipo semelhante e com maior número de nódulos que aquelas inoculadas com NGRΔ*syrM2*, que por sua vez apresentam uma nodulação mais eficiente que as plantas cultivadas com a estirpe NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*. Nenhuma alteração fenotípica foi observada em *Vigna*unguiculata nodulada pelas estirpes mutantes quando comparada a nodulação por NGR234, sugerindo que nessa leguminosa ambos os ativadores SyrM1 e SyrM2 não afetam a simbiose (tabela 1). As partes aéreas das plantas analisadas podem ser observadas na figura 4.

FIGURA 4 - FENÓTIPO DA PARTE AÉREA. As plantas foram inoculadas com as seguintes estirpes: A - NGR234, B - NGR∆*syrM1*, C - NGR∆*syrM2* ou D - NGR∆*syrM1*∆*syrM2*. O Teste t foi utilizado como método estatístico para analisar o nível de significância dos resultados.



FONTE: O autor.

TABELA 1 – EXPERIMENTO DE NODULAÇÃO REALIZADO COM AS ESTIPES NGR234, NGRΔ*syrM1*, NGRΔ*syrM2* e NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*.Os dados representam a média± desvio padrão do número de nódulos formados.

Planta	**NGR234**	**NGRΔsyrM1**	**NGRΔsyrM2**	**NGRΔsyrM1/ ΔsyrM2**
Phaseolus vulgaris [n= 6]	6 ± 4 [a]	3 ± 3 [a]	101 ± 16 [b]	41 ± 7 [c]
Tephrosia vogelii [n= 5]	37 ± 12 [a]	33 ± 6 [a]	9 ± 5 [b]	2 ± 3 [c]
Macroptilium atropurpureum [n=6]	18 ± 8 [a]	24 ± 5 [a]	3 ± 3 [b]	8 ± 7 [b]
Vigna unguiculata [n= 5]	55 ± 15 [a]	36 ± 22 [a]	28 ± 7 [a]	32 ± 20 [a]

FONTE: O autor.
NOTAS: O experimento foi realizado uma única vez e o teste t de Student foi utilizado para comparar as estirpes em cada uma das espécies de planta.
(n) Número de plantas utilizado para cada estirpe.
(a, b, c) Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais, enquanto letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Em *Sinorhizobiummeliloti*, SyrM é vista como uma proteína regulatória global, que influencia a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de fatores Nod, produção de exopolissacarídeos e sulfatação de lipopolissacarídeos (SWANSON *et al*., 1993; FELLAY *et al*. 1995; BARNETT *et al.* 1998; KEATING *et al.,* 2007). NGR234 possui duas cópias de *syrM* (*syrM1* e *syrM2*) localizadas no plasmídeo simbiótico pNGR234*a* (FREIBERG *et al*., 1997), que são muito similares aos genes *syrM* de *Sinorhizobiummeliloti* (BARNETT e LONG, 1990).

Em 2004, Kobayashi e colaboradores sugeriram que a transcrição de *syrM*2 está sob o controle de um *nod-box*, que é ativado porNodD1na presença de flavonoides. Esses mesmos autores também encontraram uma provável sequência *syrM-box* na região promotora de *nodD*2 e *y4xD* e demonstraram que SyrM2 é necessário para a expressão de *nodD2*. As análises de expressão gênica do presente trabalho confirmaram a atividade indutora de SyrM2 sobre *nodD2* e também sobre *y4xD*. Esses resultados foram confirmados pelo EMSA, que mostrou a capacidade de SyrM2 de reconhecer e interagir com a região regulatória de *y4xD* e *nodD2*.No entanto, na presença de flavonoides, *nodD2*pareceu ser expresso mesmo na ausência de SyrM2, embora em níveis reduzidos. Isso sugere um possível envolvimento de outro ativador transcricional na regulação de *nodD2*. A análise da expressão dessa região promotora indicou que este ativador não é SyrM1, uma vez que sua inativação não alterou os níveis de expressão de *nodD2*, quando

comparado com o selvagem. NGR234 possui em seu genoma genes codificadores do par regulatório NodVW, além de outros como SyrA, SyrB e NolR, cuja influência na cascata regulatória ainda são desconhecidas. Estudo anterior com estirpe mutante *nodV*⁻, bem como análise de expressão de diversos alvos de NodW, não identificaram qual sua função e sugerem que esta deve ser apenas minoritária (KAMBARA, 2008). Futuras análises funcionais destes e de outros genes serão necessárias para esclarecer suas funções.

A análise da expressão de *nopB* também confirmou que sua expressão ocorre de maneira dependente de flavonoides e NodD1 (MARIE *et al*., 2004; WASSEM *et al*., 2008), e revelou que esta é tardiamente estimulada por SyrM2, uma vez que na ausência de SyrM2 a expressão de *nopB* é menor que na presença (figura 1).Estudos prévios já haviam demonstrado regulação direta dos genes do TTSS, entre eles *nopB*, por TtsI de maneira dependente de flavonoides (VIPREY *et al*., 1998; MARIE *et al*., 2001; KRAUSE *et al.*, 2002; MARIE *et al*., 2004; WASSEM *et al,* 2008), onde a expressão de *nopB* é completamente abolida na ausência de TtsI. Wassem e colaboradores (2008) demonstraram que o regulador transcricional TtsI se liga a uma sequência conservada *tts-box* presente na região regulatória de *nopB* e ativa sua transcrição. Dados obtidos por Pinheiro, F. (comunicação pessoal) mostram que SyrM2 modula a expressão de TtsI, uma vez que seus níveis de expressão são menores no mutante *syrM2*⁻. Assim, é possível que SyrM2 desempenhe seu papel na regulação de *nopB* através de um efeito indireto sobre TtsI, tendo NodD2 como intermediário, já que este é seu alvo direto. Dessa forma, os dados obtidos neste trabalho para a regulação de *nopB* estão de acordo com o modelo proposto por Kobayashi (2004) e indicam que NodD2 afeta a expressão de *ttsI*.

SyrM1 não parece estar envolvida na regulação de *nodD2*, mas pode desempenhar uma atividade repressora em *y4xD* e *nopB*, atenuando a expressão desses genes. Essa observação, no entanto, não está de acordo com Hanin e colaboradores (1998), que relataram o gene *nopB* (anteriormente chamado de *nolB*) como sendo ativado por SyrM1 após 24 horas de indução com apigenina. A ação repressora de SyrM1,observada no presente trabalho,sobre a regulação de *y4xD* e *nopB* não deve ocorrer diretamente, mas através de regulação dos reguladores destes genes. Novamente, com relação a *nopB*, o principal candidato é *ttsI,* uma vez que SyrM1 parece ter efeito repressor sobre este (Pinheiro, F., comunicação

pessoal). Entretanto, os efeitos de SyrM1, assim como de SyrM2, sobre *ttsI* tambémdevem ser indiretos, uma vez que sua região regulatória não possui sítio *syrM-box*, sugerindo que ainda deve haver outro intermediário. Uma vez que *nodD2* é ativado por SyrM2 e pode reconhecer o *nod-box* presente na região regulatória de *ttsI*, este é o provável intermediário. Por outro lado, o efeito repressor de SyrM1 deveria ser observado também na expressão de *nodD2*. Ou seja, os níveis de expressão de *nodD2* também deveriam ser mais altos na estirpe NGRΔ*syrM1*, o que não foi observado (figura 1).

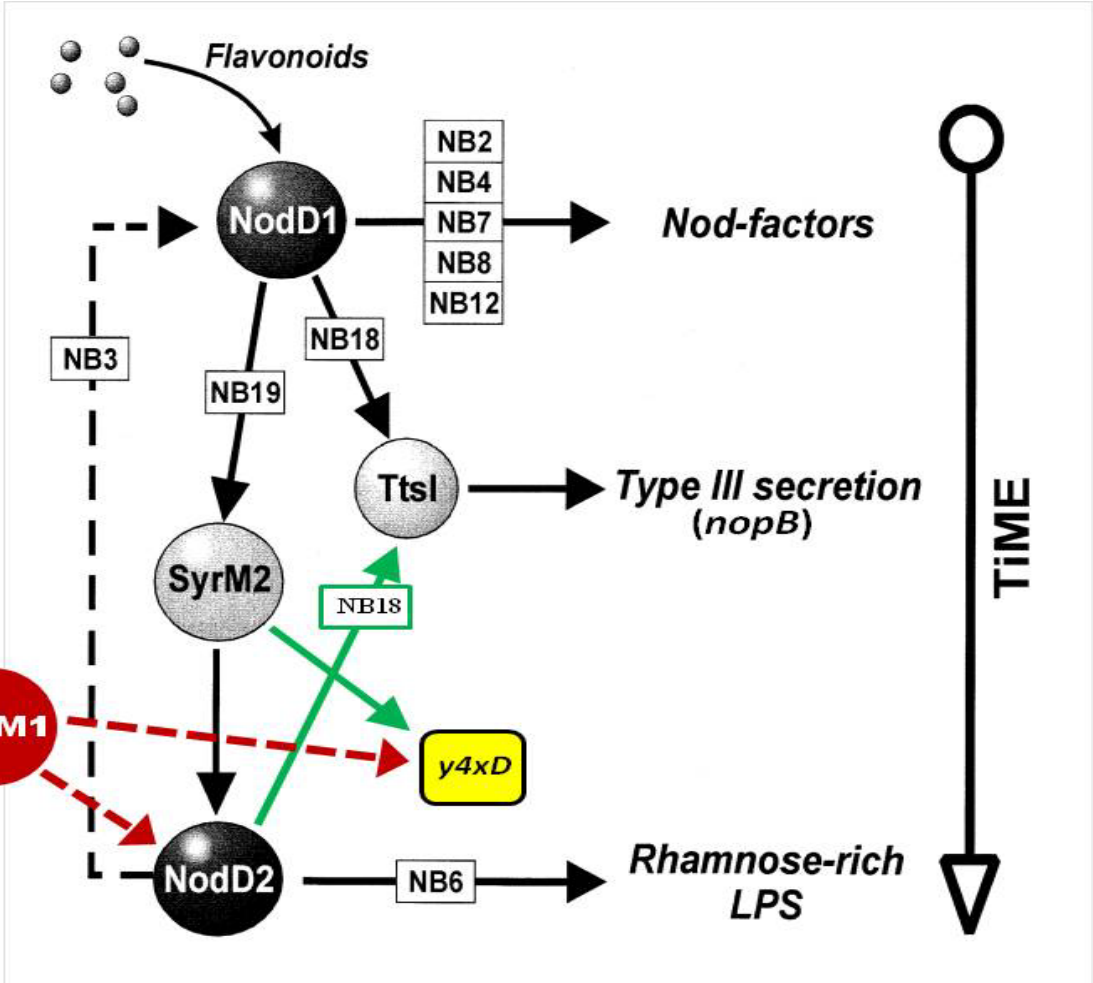
Nenhuma influência de flavonoides, NodD1, SyrM1 ou SyrM2 foi verificada sobre a regulação dos genes *rhcC1* e *nodPQ,* que parecem ser constitutivamente expressos. Um comportamento semelhante de *rhcC1* também foi observado em *Bradyrhizobiumjaponicum* (KRAUSE *et al*., 2002) e em *Sinorhizobiumfredii* USDA257(KOVÁCS *et al*. 1995). Por outro lado, Hanin e colaboradores (1998) demonstraram uma forte indução de *rhcC1* em NGR234 a partir de 24 horas,através de fusão transcricional com β-galactosidase, sendo essa ativação totalmente dependente de SyrM1 e de apigenina. Contudo, os ensaios de expressão (utilizando *gfp* como repórter) da região regulatória de *rhcC1* foram repetidos cinco vezes no presente estudo, sendo um deles mantido por 252 horas e nenhuma diferença foi observada (figura 6).Além disso, também foi observado no presente estudo que esse gene não é induzido pelo principal regulador da cascata de nodulação de NGR234, NodD1 (figura 2). Esta observação está de acordo com a possível expressão constitutiva de *rhcC1*. Por fim, esse mesmo padrão de expressão constitutiva de *rhcC1* em NGR234 também foi observado por Marie e colaboradores (2004), através da construção de fusão transcricional com β-galactosidase, dando suporte aos resultados obtidos no presente trabalho e também discordando dos dados obtidos por Hanin e colaboradores (1998).

Com relação à expressão de *nodPQ*, Hanin e colaboradores (1998) observaram que mutantes *syrM1*$^{-}$ produzem muito menos fatores Nod sulfatados que a bactéria selvagem NGR234 e sugeriram que SyrM1controla o nível de fatores Nod sulfatados através da ativação de uma das duas cópias de *nodPQ*. O experimento desses autores foi realizado através de hibridização competitiva de RNA contra cosmídeos que continham as cópias de *nodPQ*, mas também outros genes vizinhos, o que pode levar a incorreta identificação do gene alvo regulado. No presente trabalho, a expressão de *nodPQ*, analisada através de ensaio de

expressão gênica com o gene repórter *gfp*, não confirmou a hipótese sugerida por Hanin e colaboradores (1998). Em *Rhizobium* sp. NGR234 o gene*noeE* codifica uma sulfotransferase específica de fatores Nod, queusa PAPS como doador de sulfato. Com base nessa informação, é possível levantar a hipótese de *noeE* ser o responsável pela menor produção de fatores Nod sulfatados, observada por Hanin e colaboradores (1998), ao invés de *nodPQ*. É importante ressaltar que os rizóbios possuem uma segunda cópia de genes envolvidos com a síntese de PAPS, denominados *cysDN*(SNOECK *et al*., 2003),o que inclui NGR234 (SCHMEISSER *et al*., 2009). Entretanto, estes genes estão envolvidos com a produção de aminoácidos contendo enxofre e provavelmente não são regulados por NodD1, uma vez que não possuem *nod-box* em sua região regulatória. Para confirmar se a baixa sulfatação de fatores Nod, observada na estirpe *syrM1*- por Hanin e colaboradores (1998), é decorrente de alteração na expressão *cysDN* será necessária a análise de expressão desses genes, já que não há dados na literatura.

Com base nos resultados obtidos através das análises de expressão gênica e dos ensaios de mobilidade eletroforética, foi possível adicionar alguns passos na cascata regulatória proposta por Kobayashi e colaboradores (2004): SyrM2 ativa a transcrição do gene hipotético *y4xD* no mesmo tempo em que ocorre a ativação de *nodD2*; posteriormente, SyrM2 participa da indução de *nopB* através da ativação de *nodD2* que deve ativar a transcrição de TtsI; ainda mais tarde, SyrM1 age atenuando a transcrição de *y4xD* e *nopB* indiretamente (Figura 5).

FIGURA 5 - MODELO PROPOSTOPOR ESTE TRABALHO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *RHIZOBIUM* SP. NGR234. As linhas contínuas indicam uma atividade indutora, enquanto as linhas tracejadas indicam uma atividade repressora. NB=*nod-box.*



FONTE: Kobayashi *et al*. (2004), modificada pelo autor deste trabalho.

.

Quanto à influência de SyrM1 e SyrM2 no fenótipo de nodulação foi observado que a ausência de SyrM2 leva a um aumento no número de nódulos nas raízes de *Phaseolus vulgaris* e à diminuição da nodulação em *Tephrosia vogelii*e*Macroptilium atropurpureum*(tabela 1).Por outro lado, *Vigna unguiculata* aparentemente não responde a esses ativadores, não sendo afetada pela ausência de SyrM1 e/ou SyrM2. O fenótipo de nodulação é uma característica hospedeiro-específica e corresponde à resposta das plantas hospedeiras em relação à troca de sinais moleculares entre ela e o rizóbio. É possível que algumas plantas, tal como *Phaseolusvulgaris*,percebam alguns sinais, como Nops que são secretadas pelos

rizóbios, por exemplo, como sendo sinais de patógenos e gerem uma resposta de defesa contra o organismo que a secreta, dificultando a formação de nódulos. Por outro lado, em hospedeiras como *Tephrosiavogelii* essas mesmas Nops podem funcionar reprimindo a indução de uma reação de defesa da planta de maneira análoga as proteínas efetoras dos fitopatógenos, favorecendo a nodulação (VIPREY *et al*., 1998;KRAUSE *et al*., 2002; KRISHNAN *et al*., 2003; MARIE *et al*., 2003; LORIO, 2004). Uma vez que a expressão do TTSS é controlada pela cascata regulatória que inclui SyrM2 (e potencialmente SyrM1), um dos potenciais causadores dos diferentes fenótipos observados nas plantas testadas, é TTSS. Diferentes plantas respondem de forma diferencial a presença ou ausência do TTSS de NGR234, sendo que outras são completamente indiferentes à sua presença (MARIE *et al*., 2003) ou respondem diferencialmente a cada um dos efetores (KAMBARA *et al*., 2009).

Os resultados obtidos indicam que SyrM1 sozinha não é capaz de produzir nenhum efeito fenotípico significativo nas plantas testadas, sugerindo pouca ou nenhuma atividade desse regulador na simbiose destas hospedeiras. Uma possibilidade é que SyrM1possua um papel biológico de apenas otimizar os fatores que controlam uma eficiente nodulação e o reconhecimento específico entre os parceiros simbióticos (HANIN *et al*., 1998) (tabela 1).

Curiosamente, em *Phaseolusvulgaris* e*Tephrosiavogelii*é provável que ocorra uma complementaridade das atividades de SyrM1 e SyrM2, que é hospedeiro-específica. Em *Phaseolusvulgaris* o mutante duplo para *syrM1* e *syrM2* apresentou um fenótipo intermediário entre aqueles observados em NGRΔ*syrM2* e NGR234. Uma possível explicação para isso seria o fato de *syrM2* desempenhar uma função que diminuísse o número de nódulos enquanto *syrM1* desempenhasse, apenas na ausência de SyrM2, um papel benéfico para a nodulação. Esse efeito exclusivamente detectado na ausência de *syrM2*, pode ocorrer *in vivo*, quando o nível de expressão de *syrM2* diminui, o que ocorre no nódulo maduro, como demonstrado por Perret e colaboradores (2000), que não detectaram expressão de *syrM2* no nódulo. Outro tipo de complementaridade entre *syrM1* e *syrM2* foi observada em *Tephrosia vogelii,* onde ambos os ativadores SyrM1 e SyrM2 devem possuir efeito positivo para a nodulação, sendo a ação de SyrM1 mascarada por SyrM2. Isso explicaria o fato da nodulação nas plantas inoculadas com as estirpes NGR234 e NGRΔ*syrM1* serem semelhantes e apresentarem menor número de

nódulos que a aquelas inoculadas com NGRΔ*syrM2*, que por sua vez apresentam nodulação não tão eficiente quanto as plantas cultivadas com a estirpe NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*, onde ambos SyrM1 e SyrM2 estão ausentes (tabela 1).

MATERIAIS E MÉTODOS

Manipulação microbiológica

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria–Bertani (Sambrook *et al*., 1989). NGR234 e suas estirpes mutantes foram crescidas a 28°C em meio mínimo para *Rhizobium* contendo succinato como fonte de carbono (RMS) (BROUGHTON *et al*., 1986) ou TY (BERINGER, 1974). Gentamicina, canamicina, rifampicina e ampicilina foram adicionadas nas concentrações de 15, 50, 100 e 250 µg ml^{-1} respectivamente. As construções utilizando os vetores de clonagem pK18*mobsacB*, pPROBE-GT ou pPROBE-GT' foram transferidos para NGR234 e para as linhagens derivadas por conjugação bi-parental (SIMON *et al*., 1983).

Construção das estirpes mutantes de NGR234

Para obter um mutante com uma deleção em *syrM1*, o plasmídeo pGEM-*syrM1*cvsup (PINHEIRO, 2009), que continha uma cópia intacta de 1,9 kb do gene *syrM1* e sua região regulatória, foi digerido com *Nar*I e *Cla*I para deletar parte das regiões regulatória e codificante de *syrM1*. Após a deleção ainda restou um fragmento de cerca de 760 pb que foi clonado no vetor pK18*mobsacB*. Para promover a deleção em *syrM2*, um fragmento de aproximadamente 1800 pb contendo toda região regulatória e codificante do gene *syrM2* foi amplificado, e clonado no vetor pTZ57R. A deleção de aproximadamente 800 pb foi provocada pela clivagem com *Nar*I e *Xho*I. O fragmento remanescente de cerca de 960 pb foi então clonado no vetor pK18*mobsacB* (SCHÄFER *et al*., 1994). Em ambos os casos, os plasmídeos resultantes foram mobilizados para NGR234 por conjugação bi-parental. Para a construção do mutante duplo, com *syrM1* e *syrM2* deletados, o plasmídeo pK18-Δ*syrM1* foi transferido para a estirpe mutante NGRΔ*syrM2*. A confirmação das estirpes resultantes foi realizada por hibridização.

Construção das fusões transcricionais com gfp

Para a construção das fusões transcricionais com o gene repórter *gfp,* que codifica a proteína verde fluorescente, primeiramente foram planejados oligonucleotídeos iniciadores com sítios de restrição *Bam*HI e *Sac*I para amplificar fragmentos contendo as regiões regulatórias dos genes *y4xD* (cerca de 330 pb), *nodPQ* (cerca de 1000 pb) e a região intergênica entre *nopB* e *rhcC1* (aproximadamente 880 pb). As regiões regulatórias referentes a *y4xD* e *nodPQ* foram ligadas no vetor pTZ57R enquanto a região intergênica entre *nopB* e *rhcC1* foi ligada ao plasmídeo pGEM-3Zf. Em seguida foi realizada a digestão desses plasmídeos com *Sac*I e *Bam*HI e os fragmentos liberados foram purificados e clonados nos vetores pPROBE do seguinte modo: *y4xD* e *nodPQ* foram clonados no pPROBE-GT e a região intergênica *nopB*/*rhcC1* foi clonada tanto em pPROBE-GT quanto em pPROBE-GT' para que ficasse nas duas orientações. As construções foram confirmadas por PCR e sequenciamento e posteriormente transferidas para as estirpes mutantes e selvagem de NGR234, por conjugação bi-parental.

Ensaios de expressão gênica

As culturas de rizóbios, cultivadas até atingir DO_{595} de 0.5–0.6, foram diluídas para DO_{595} de 0.1 em meio RMS e induzidas com uma mistura de apigenina, crisina, genisteína, kampferol e naringenina na concentração de 10^{-6} M. Tanto a DO_{595} quanto a intensidade de fluorescência de GFP foram mensuradas em leitor de microplacas Infinite 200 PRO NanoQuant (TECAN). As leituras foram realizadas em 535 nm após excitação a 485 nm. Os resultados representam a média e o desvio padrão de cinco experimentos independentes.

Expressão e purificação de SyrM1-His e SyrM2-His

As regiões codificadoras dos genes *syrM1* e *syrM2* foram amplificadas por PCR e então clonadas no vetor de expressão pET28a. A fidelidade da PCR foi confirmada por sequenciamento. A superexpressão dessa construção foi realizada em *E. coli* BL21. Para isso, a cultura foi incubada a 37°C até atingir a DO_{595} de

aproximadamente 0,5 e em seguida foram adicionados 250 µM de D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). A cultura foi então mantida a 20°C *overnight* para indução das proteínas de fusão contendo uma cauda de histidinas. As células foram coletadas por centrifugação (6000 rpm, 10 min, 4°C), ressuspensas em 30 mL de uma solução de Tris-NaCl (50mM Tris e 100mM NaCl) adicionada de 30 µL de PMSF 0,1 M e lisadas por sonicação. O lisado foi centrifugado (10000, 20 min, 4°C) e o *pellet* foi lavado duas vezes com 30 mL da mesma solução de Tris-NaCl citada anteriormente. Após as lavagens, o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de solução de sarcosina (40mM Tris, 50mM NaCl e 0,1% sarcosina) e incubado *overnight* a 20°C sob agitação. Posteriormente, essa solução foi centrifugada (4400g, 15 min) e o sobrenadante foi separado para purificação em coluna HiTrap Chelating, carregada com níquel, através do sistema de cromatografia AKTA (GE Healthcare). A cromatografia foi feita em tampão A (20mM Imidazol, 50mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% Triton, 50mM glicina e 10% de glicerol) e as proteinas eluidas com gradiente contínuo de imidazol. A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970) e as frações contendo as proteínas His-SyrM1 ou His-SyrM2 foram dialisadas contra tampão de armazenamento (50mM Tris; 50mM NaCl; 50% glicerol) e armazenadas a -20°C.

Teste de mudança de mobilidade eletroforética

Fragmentos de PCR marcados com ^{32}P foram incubados por 20 minutos em tampão Binding(50mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4mM EDTA; 10mM KCl; 0,5mM DTT; 5% glicerol; 50µg/mL BSA; 100mM NaCl) com as concentrações indicadas de SyrM1 ou SyrM2 e, em seguida, as reações foram resolvidas em gel nativo de poliacrilamida a 4%, que havia sido previamente submetido a uma pré-corrida de 20 minutos a 50V, submerso em tampão nativo 1X (Tris 50 mM; 2M glicina; 10 mM EDTA; 8 mM $MgSO_4$). A eletroforese foi mantida a aproximadamente 24 mA por duas horas. Depois de seco o gel foi exposto a uma tela de captura e então os sinais foram detectados com STORM Molecular Dynamics PhosphoImager (Amersham Biosciences).

Ensaio de nodulação

Os testes de nodulação foram realizados em frascos Magenta™ como descrito por Skorpil e colaboradores (2005). Todas as plantas foram crescidas à temperatura de 28°C com 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Cada planta foi inoculada com uma concentração de bactérias igual a 10^7 e cultivadas por 6-8 semanas. O número e a massa de nódulos maduros (Fix^+), bem como o massa fresca da parte aérea foram avaliados.

Análise estatística

O teste t de Student foi utilizado como método estatístico para comparar os resultados de expressão gênica e de nodulação, sendo considerado um valor de significância menor ou igual a 0,05.

REFERÊNCIAS

BARNETT, M.J.; LONG, S.R. DNA sequence and translational product of a new nodulation regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3695-3700, 1990.

BARNETT, M.J.; SWANSON, J.A.; LONG, S.R. Multiple Genetic Controls on *Rhizobium meliloti syrA*, a Regulator of Exopolysaccharide Abundance**. Genetics Society of America**, v. 148**,** p.19–32, 1998.

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

BROUGHTON, W.J. *et al.* Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. **TheJournal off Cell Biology**, v102, p.1173-1182, 1986.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5641-5652, 2000.

BROUGHTON, W.J. *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.

DEAKIN, W. J. *et al*. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p. 499-507, 2005.

FELLAY, R. *et al*. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 16, p. 657-667, 1995.

FREIBERG, C. *et al*. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, 1997.

HANIN, M. *et al*. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulfated Nod factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 343-350, 1998.

JONES, K. M. *et al*. How rhizobial symbionts invade plants: the *Shinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 619-633, 2007.

KAMBARA, K. **Regulation and effects of the type-three secretion system of *Rhizobium* species NGR234**. Tese (Docteur ès sciences) – Faculdade de ciências,Universidade de Genebra, Suíça, 2008.

KAMBARA, K. *et al*. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. **Molecular Microbiology**, v. 71, p. 92–106, 2009.

KEATING, D.H. *Sinorhizobium meliloti* SyrA Mediates the Transcriptional Regulation of Genes Involved in Lipopolysaccharide Sulfation and Exopolysaccharide Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 2510–2520, 2007.

KOBAYASHI, H. *et al*. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234.**Molecular Microbiology**, v. 51, p. 335-347, 2004.

KOVÁCS, L.G. *et al*. Transcriptional organization and expression of *nolXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. **Molecular Microbiology**, v.17, p.923–933, 1995.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GÖTTFERT, M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 15, p.1228–1235, 2002.

KRISHNAN, H.B. *et al*. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulationare associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii*USDA257. **Molecular Plant-Microbe Interact**,v. 16, p.617–625, 2003.

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

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

MARIE, C. *et al*. 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 Interact**,v. 17, p. 958-966, 2004.

MILLER, W. G.; LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E**.** Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vector.**Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1243-1250, 2000.

PINHEIRO, F.C. **Análise de expressão dos ativadores de transcrição SyrM1, SyrM2, NodD1, NodD2 e TtsI de *Rhizobium* sp. NGR234.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

POUPOT, R.*et al*.*Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate.**FEBS Letters**, v. 368, p. 536-540, 1995.

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

SAAD, M.M. *et al*. NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.1173-1181, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.5463-5467, 1977.

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

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

SCHMEISSER, C. *et al*. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4035-4045, 2009.

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, p.784-791, 1983.

SNOECK, C. *et al*. Identification of a Third Sulfate Activation the CysDN Sulfate Activation Complex System in *Sinorhizobium* sp. Strain BR816.**Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2006-2014, 2003,

SKORPIL, P.*et al*. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii.* **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1304-1317, 2005.

SOTO, M.J.; SANJUÁN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, v.152, p. 3167-3174, 2006.

SWANSON, J.A.; MULLIGAN, J.T.; LONG, S.R. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti.***Genetics**, v. 134, p. 435-444, 1993.

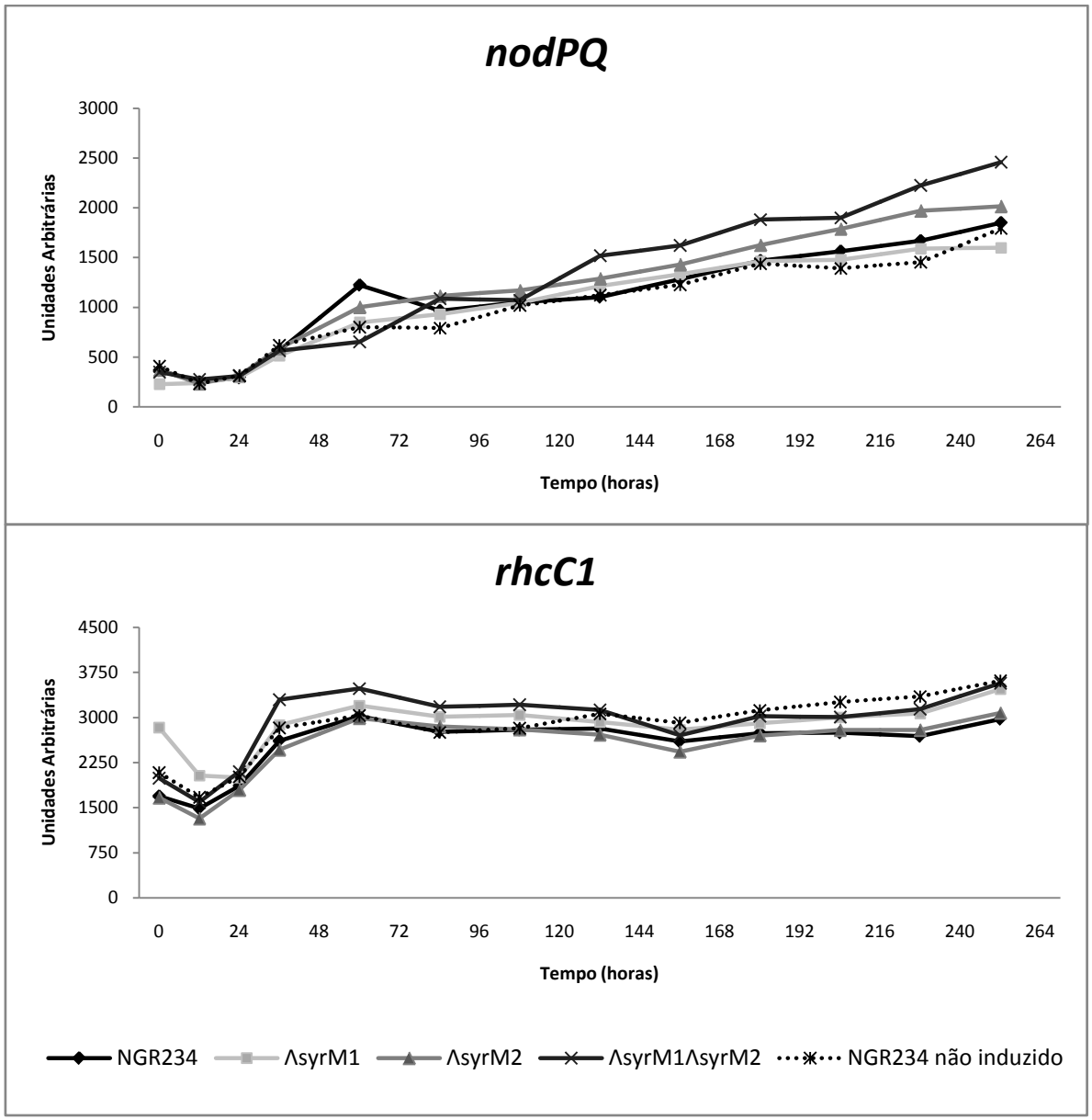
TRINICK, M.J. Relationship amongst the fast-growing *Rhizobium* of *Lablab purpureus, Leucaena leucocephala, Mimosa* sp., *Acacia farnesiana,* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other *Rhizobium* groups. **Journal Apllied Bacteriology**, v. 49, p. 39-53, 1980.

VIPREY, V. *et al*. Simbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*.**Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

WASSEM, R.*et al*. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts-boxes*. **Molecular Microbiology**, v. 68, p. 736-748, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR

FIGURA 6– INDUÇÃO POR FLAVONÓIDES DE EXPRESSÃO DE GFP SOB CONTROLE DAS REGIÕES REGULATÓRIAS DE *nodPQ* e *rhcC1*. Os gráficos representam uma única repetição experimental.



FONTE: O autor.

5. DISCUSSÃO

As proteínas regulatórias NodD determinam o controle inicial da interação simbiótica entre plantas hospedeiras e rizóbios, ativando a expressão de genes *nod* na presença de sinais moleculares específicos da planta, os flavonoides (BROUGHTON *et al*., 2000). Os genes *nod* codificam proteínas responsáveis pela síntese e liberação dos fatores Nod, que guiam o desenvolvimento nodular e permitem que a infecção prossiga, além de estarem envolvidos na determinação da especificidade do hospedeiro. Além dos fatores Nod, outros produtos de rizóbios parecem ser necessários para o desenvolvimento contínuo do cordão de infecção. Entre eles estão polissacarídeos extracelulares (EPS) também denominados exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e β-glicanos cíclicos, bem como proteínas exportadas pelo TTSS (BROUGHTON *et al*., 2006; SOTO *et al*., 2006; JONES *et al*., 2007).

Em *Rhizobium* sp. NGR234 foi demonstrado que NodD1 é o principal ativador de uma cascata regulatória responsável pela expressão de 75 *loci* envolvidos no processo simbiótico, através de sua interação com 19 sequências *nod-box* (KOBAYASHI *et al*., 2004). Embora NodD1 seja o regulador central envolvido na regulação dos genes *nod*, para que um fino controle da transcrição dos *loci* de nodulação ocorra de maneira espacial e temporalmente apropriada, a presença de outros reguladores é necessária (KNIGHT *et al*., 1986; KOBAYASHI *et al*., 2004). Algumas estirpes de rizóbio possuem uma classe de reguladores simbióticos chamados SyrM, que são homólogos às proteínas NodD e pertencem a mesma família de ativadores transcricionais (LysR).

Em *Sinorhizobiummeliloti*, SyrM é vista como uma proteína regulatória global, que influencia a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de fatores Nod, produção de exopolissacarídeos e sulfatação de lipopolissacarídeos. Em NGR234 existem duas cópias de *syrM* (*syrM1* e *syrM2*) localizadas no plasmídeo simbiótico pNGR234*a* (FREIBERG *et al*., 1997), que são muito similares aos genes *syrM* de *Sinorhizobiummeliloti* (BARNETT e LONG, 1990) e de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*(MICHIELS *et al*., 1993).

Segundo Kobayashi e colaboradores (2004), *syrM2* faz parte de uma cascata de regulação que inclui NodD1 e NodD2, e controla vários *loci* que são

tardiamente induzidos por flavonoides. Esses autores sugeriram que a transcrição de *syrM*2 está sob o controle de um *nod-box* que é ativado por NodD1na presença de flavonoides, encontraram uma provável sequência *syrM-box* na região promotora de *nodD*2 e demonstraram que SyrM2 é necessário para a expressão desse gene. Estes mesmos autores observaram baixos níveis de expressão de *syrM2* logo após a indução por flavonoides e uma ativação significativa do promotor *nodD2* após seis horas de indução. Isso sugere que a ativação plena da cascata regulatória NodD1-SyrM2 requer tempo, pois é preciso ter um número suficiente de moléculas de SyrM2 para permitir a plena expressão de *nodD2* (KOBAYASHI *et al*., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram que *nodD2* é ativado por SyrM2 de maneira dependente de flavonoides, fato que foi observado já a partir de 12 horas após indução (primeiro ponto de leitura da expressão gênica realizada), estando de acordo com Kobayashi e colaboradores (2004). Os dados deste trabalho sugerem ainda que a ação ativadora de SyrM2 nesse promotor é contínua ao longo do tempo, chegando a aumentar a expressão de *nodD2* cerca de três vezes após 108 horas da adição de flavonoides. No entanto, na presença de flavonoides, *nodD2* pareceu ser expresso mesmo na ausência de SyrM2, embora em níveis reduzidos.Isso sugere um possível envolvimento de outro ativador transcricional na regulação de *nodD2*. A análise da expressão dessa região promotora indicou que este ativador não é SyrM1, uma vez que sua inativação não alterou os níveis de expressão de *nodD2*, quando comparado com o selvagem.

Outra provável sequência *syrM-box* foi encontrada na região promotora do gene hipotético *y4xD* (KOBAYASHI *et al.,* 2004), sugerindo uma possível regulação por SyrM. A análise da expressão da região regulatória de *y4xD* realizada neste trabalho demonstrou que SyrM2 faz parte da regulação desse gene, atuando como um indutor da sua expressão na presença de flavonoides, a partir de 12 horas de indução. Além de SyrM2, NodD1 também foi capaz de ativar a expressão de *y4xD* (dados não mostrados). No entanto, devido a presença de um provável *syrM-box* a montante de *y4xD*, é possível que a influência de NodD1 na expressão desse promotor seja indireta e intermediada por SyrM2, da mesma maneira como acontece com *nodD2*. Contrariamente, SyrM1 parece desempenhar uma atividade repressora de *y4xD* a partir de 36 horas após indução. No entanto, é provável que SyrM1 aja apenas como um atenuador do nível de expressão de *y4xD*, não sendo capaz de reprimir totalmente esse gene na presença de SyrM2. Além disso, a similaridade de

expressão das estirpes NGRΔ*syM2* e NGRΔ*syM1*/Δ*syM2* indica não haver interação entre SyrM1 e SyrM2 na regulação dos promotores de *y4xD* e *nodD2*.

O ensaio de mobilidade eletroforética realizado confirmou a interação de SyrM2 com o *syrM-box* de *nodD2* e com a região regulatória de *y4xD*, confirmando que o ativador SyrM2 realmente reconhece esses sítios, atuando diretamente na regulação gênica em ambos os casos. SyrM1 é uma proteína constituída por 337 aminoácidos, muito semelhante a SyrM2 que possui 339 aminoácidos. Além disso, SyrM1 e SyrM2 apresentam mais de 70% de similaridade, ambos são ativadores de transcrição pertencentes à família LysR, possuem massa molecular de aproximadamente 37,5 KDa e domínio de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice (HTH). Devido a essa similaridade, e à observação de que SyrM1 possivelmente reprime *y4xD*, foi realizado um EMSA para testar se SyrM1 também é capaz de interagir com os mesmos sítios testados para SyrM2. No entanto, os resultados obtidos não revelaram interação de SyrM1 nem com o *syrM-box* de *nodD2*, nem com a região regulatória de *y4xD*. Isso reforça a falta de atividade de SyrM1 sobre *nodD2* observada no ensaio de expressão gênica e sugere que a ação de SyrM1 sobre a regulação de *y4xD* não ocorre diretamente.

A análise da expressão de *nopB* também confirmou que sua expressão ocorre de maneira dependente de flavonoides e NodD1 (MARIE *et al*., 2004; WASSEM *et al*., 2008), e revelou que esta é tardiamente estimulada por SyrM2, uma vez que na ausência de SyrM2 a expressão de *nopB* é menor que na presença. O gene *nopB* é o primeiro de um operon que contém vários genes cruciais para o funcionamento do TTSS em USDA257 e NGR234 (MARIE *et al*., 2001; VIPREY *et al*., 1998). Saad e colaboradores (2005) demonstraram que NopB é uma proteína expressa somente após indução por flavonoides, secretada pelo TTSS de NGR234 (assim como NopX e NopA) e essencial para secreção das proteínas efetoras Nop. Esses mesmos autores também demonstraram que *nopB* faz parte da estrutura do pili do TTSS, juntamente com NopX e NopA. Outro estudo também já havia sugerido que a expressão de *nopB* é dependente não apenas de flavonoides, mas também de NodD1 e TtsI, sendo completamente abolida na ausência desses ativadores (MARIE *et al*., 2004). Wassem e colaboradores (2008) demonstraram que o regulador transcricional TtsI se liga a uma sequência conservada *tts-box* presente na região regulatória de *nopB* e ativa sua transcrição. Além disso, dados anteriores obtidos por Pinheiro, F. (comunicação pessoal) mostraram que SyrM2 modula a expressão de

TtsI, uma vez que seus níveis de expressão foram menores no mutante *syrM2*$^{-}$. Assim, os resultados aqui obtidos apontam para a possibilidade de SyrM2 aumentar a expressão de *nopB* através de um efeito indireto sobre *ttsI*, tendo *nodD2* como intermediário.

Também foi observado que o promotor de *nopB* é relativamente forte (49702+/-802 unidades após 108 horas) comparado com os promotores de *y4xD* (3054+/-223 unidades após 108 horas) e *nodD2* (7188+/-695 unidades após 108 horas). Isso está de acordo com a observação de que genes envolvidos na formação do aparato de secreção, tal como *nopB,* estão sob o controle de promotores fortes ou moderados (WASSEM *et al*., 2008).

Hanin e colaboradores (1998) demonstraram que o promotor de *nopB* (anteriormente chamados de *nolB*) é ativado por SyrM1, após 24 horas de indução com apigenina. Contudo, essa observação não foi reproduzida no presente trabalho. Contrariamente, SyrM1 parece exercer atividade repressora sobre *nopB,* que diminui a expressão desse promotor, mas não é capaz de reprimi-lo totalmente. Contudo, a ação repressora de SyrM1,observada no presente trabalho*,*sobre a regulação de *y4xD* e *nopB* não deve ocorrer diretamente, mas através de regulação dos reguladores destes genes. Novamente, com relação a *nopB*, o principal candidato é *ttsI,* uma vez que SyrM1 parece ter efeito repressor sobre este (Pinheiro, F. comunicação pessoal). Entretanto, os efeitos de SyrM1, assim como de SyrM2, sobre *ttsI* tambémdevem ser indiretos, uma vez que sua região regulatória não possui sítio *syrM-box*, sugerindo que ainda deve haver outro intermediário. Uma vez que *nodD2* é ativado por SyrM2 e pode reconhecer o *nod-box* presente na região regulatória de *ttsI*, este é o provável intermediário. Por outro lado, o efeito repressor de SyrM deveria ser observado também na expressão de *nodD2*. Ou seja, os níveis de expressão de *nodD2* também deveriam ser mais altos na estirpe NGRΔ*syrM1*, o que não foi observado (figura 1).

A ação repressora de SyrM1 sobre *nopB* foi iniciada apenas após 84 horas da adição de flavonoides, sendo ainda mais tardia que a atividade indutora provocada por SyrM2 sobre esse promotor, que ocorreu a partir de 60 horas. Já a expressão de *nodD2* e *y4xD* foi iniciada muito antes, a partir de 12 horas. Viprey e colaboradores (1998) sugerem que a indução tardia de genes do TTSS em comparação a genes de nodulação provavelmente ocorre porque os fatores Nod permitem a entrada do rizóbio na raiz da planta e a secreção de proteínas só

começa quando um íntimo contato entre os parceiros simbióticos já foi estabelecido. Isso também concorda com Kobayashi e colaboradores (2004), que observaram que a cascata de regulação que culmina na formação de nódulos é temporalmente regulada. Por fim, assim como em *nodD2* e *y4xD*, nenhum tipo de interação entre SyrM1 e SyrM2 na regulação de *nopB* foi observada.

Curiosamente, *rhcC1* (anteriormente chamado *nolW*), o qual é transcrito no sentido inverso de *nopB*, pareceu ser constitutivamente expresso em NGR234 nas condições deste estudo. Um comportamento semelhante do gene *rhcC1* também foi observado em *Bradyrhizobiumjaponicum* (KRAUSE *et al*., 2002) e em *Sinorhizobiumfredii* (KOVÁCS *et al*. 1995). Por outro lado, Hanin e colaboradores (1998) demonstraram uma forte indução de *rhcC1* em NGR234 a partir de 24 horas, através de fusão transcricional com β-galactosidase, sendo essa ativação totalmente dependente de SyrM1 e de apigenina. Contudo, os ensaios de expressão (utilizando *gfp* como repórter) da região regulatória de *rhcC1* foi repetido cinco vezes no presente estudo, sendo um deles mantido por 252 horas e nenhuma diferença foi observada. Todos os passos da construção da fusão transcricional em questão foram cuidadosamente verificados e testados por PCR e digestão com enzimas de restrição. O inserto contendo a região intergênica *nopB*/*rhcC1* foi ainda sequenciado, após sua clonagem no plamídeo intermediário pGEM-3Zf, para garantir sua total integridade. Por fim, também foi observado no presente estudo que esse gene não é induzido pelo principal regulador da cascata de nodulação de NGR234, NodD1. Esta observação está de acordo com a possível expressão constitutiva de *rhcC1*. Além disso, esse mesmo padrão de expressão constitutiva de *rhcC1* em NGR234 também foi observada por Marie e colaboradores (2004), através da construção de fusão transcricional com β-galactosidase, dando suporte aos resultados obtidos no presente trabalho.

Em *Sinorhizobiummeliloti*, *nodP* e *nodQ* codificam proteínas homólogas à ATP sulfurilase e APS kinase respectivamente, sendo necessários para a síntese do doador de sulfato ativado, PAPS (3’ fosfoadenosina 5’ fosfosulfato). O grupo sulfato é transferido do PAPS para o terminal reduzido dos fatores Nod pelo produto do gene *nodH* desse rizóbio, que codifica uma sulfotransferase, ou para lipopolissacarídeos pela LPS sulfotransferase codificada por *lpsS*(MULLIGAN E LONG 1989; SCHWEDOCK E LONG, 1990; SCHWEDOCK E LONG, 1992; SCHWEDOCK *et al.,* 1994; POUPOT *et al*. 1995; BARNETT, 2004). A regulação de

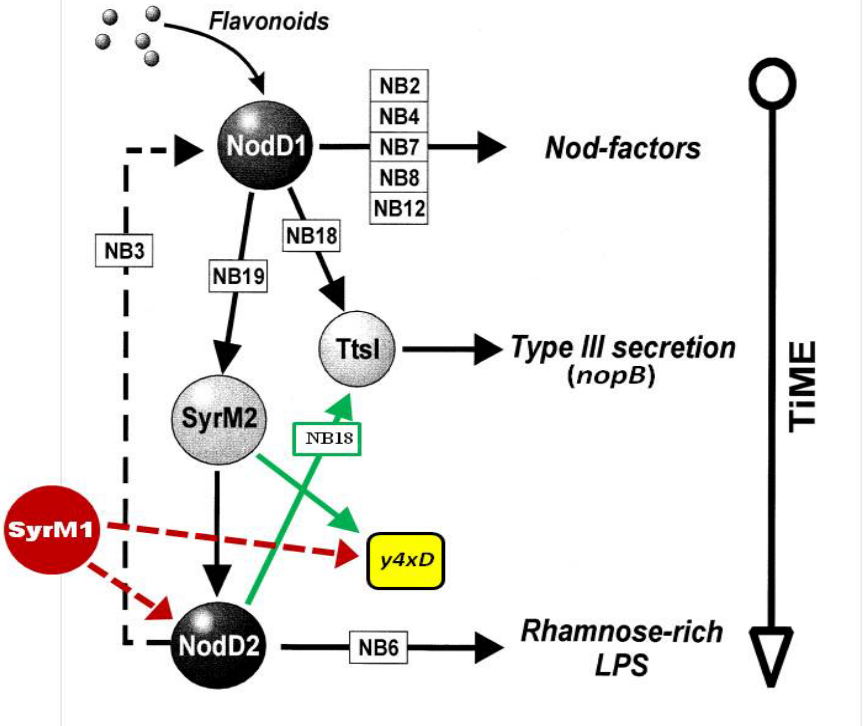
nodPQ nesse organismo pode ser feita diretamente por NodD3 e indiretamente por SyrM, através de um circuito de auto regulação onde a expressão de *nodD3* é controlada positivamente por SyrM, que por sua vez é positivamente regulado por NodD3 e pelo próprio SyrM (MULLIGAN e LONG, 1989; SWANSON *et al*., 1993; BARNETT *et al*., 1996; KONDOROSI *et al*, 1991).

Hanin e colaboradores (1998) observaram que mutantes *syrM1* produzem muito menos fatores Nod sulfatados que a bactéria selvagem NGR234 e sugeriram que SyrM1controla o nível de fatores Nod sulfatados através da ativação de uma das duas cópias de *nodPQ*. O experimento desses autores foi realizado através da hibridização competitiva de RNA de cosmídeos que continham não apenas as cópias de *nodPQ*, mas também outros genes. No presente trabalho, a indução da expressão de *nodPQ*, analisada através de ensaio de expressão gênica com o gene repórter *gfp*, não confirmou a hipótese sugerida por Hanin e colaboradores (1998). Pelo contrário, nas condições experimentais testadas, a expressão de *nodPQ* não foi induzida por flavonoides nem influenciada por NodD1, SyrM1 ou SyrM2. De acordo com os resultados observados, os genes *nodPQ* parecem ser constitutivamente expressos, assim como *rhcC1*. Em *Rhizobium* sp. NGR234 *noeE* codifica uma sulfotransferase específica de fatores Nod que também usa PAPS como doador de sulfato. Com base nessa informação, é possível levantar a hipótese de *noeE* ser o responsável pela menor produção de fatores Nod sulfatados, observada por Hanin e colaboradores (1998), ao invés de *nodPQ*. É importante ressaltar que os rizóbios possuem uma segunda cópia de genes envolvidos com a síntese de PAPS, denominados *cysDN* (SNOECK *et al*., 2003), *o* que inclui NGR234 (SCHMEISSER *et al*., 2009).Entretanto, estes genes estão envolvidos com a produção de aminoácidos contendo enxofre e provavelmente não são regulados por NodD1, uma vez que não possuem *nod-box* em sua região regulatória. Para confirmar se a baixa sulfatação de fatores Nod, observada na estirpe *syrM1-* por Hanin e colaboradores (1998), é decorrente de alteração na expressão *cysDN* será necessária a análise de expressão desses genes, já que não há dados na literatura.

Com base nos resultados obtidos através das análises de expressão gênica e dos ensaios de mobilidade eletroforética, foi possível adicionar alguns passos na cascata regulatória proposta por Kobayashi e colaboradores (2004). O esquema regulatório descrito anteriormente consiste num processo temporalmente e espacialmente modulado, onde inicialmente ocorre a interação de flavonoides com

NodD1, que logo em seguida atua na ativação de genes responsáveis pela síntese e liberação dos fatores Nod. Algumas horas mais tarde, NodD1 ativa a expressão de *ttsI* que age como intermediário na transcrição dos genes codificadores do TTSS. Finalmente, cerca de 24 horas após a indução por flavonoides, a transcrição de *syrM2* atinge nível máximo, ativado por NodD1. SyrM2, por sua vez, ativa a transcrição de *nodD2*, e o produto deste gene induz alguns *loci*, como o *fixF*, que está envolvido na síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose. Concomitantemente, NodD2 reprime a expressão de *nodD1*. Como complemento a essa cascata regulatória foi possível adicionar alguns passos: SyrM2 ativa a transcrição do gene hipotético *y4xD* no mesmo instante em que ocorre a ativação de *nodD2*; posteriormente, SyrM2 participa da indução de *nopB* através da ativação de *nodD2,* cujo produto regula o *nod-box* que controla *ttsI* (NB18), o ativador de *nopB*; ainda mais tarde, SyrM1 age atenuando a transcrição de *y4xD* e *nopB* indiretamente (Figura 7).

FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO POR ESTE TRABALHO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *RHIZOBIUM* SP. NGR234. As linhas contínuas indicam uma atividade indutora, enquanto as linhas tracejadas indicam uma atividade repressora. NB=*nod-box.*



FONTE: KOBAYASHI *et al*. (2004), modificada pelo autor deste trabalho.

Quanto ao ensaio de nodulação, os dados obtidos demonstraram que a ausência de SyrM2 (NGRΔ*syM2)* leva a diminuiçãono número de nódulos em *Tephrosia vogelii* e *Macroptilium atropurpureum*, mas provoca um aumento significativo do número de nódulos em *Phaseolusvulgaris*, em comparação com a estirpe selvagem NGR234. O fenótipo de nodulação é uma característica hospedeiro-específica e corresponde à resposta das plantas hospedeiras em relação à troca de sinais moleculares entre ela e o rizóbio. É possível quealgumas plantas, tal como *Phaseolus vulgaris*,percebam alguns sinais, tais como algumas Nops que são secretadas pelos rizóbios, como sendo patogênicas e gerem uma resposta de defesa contra o organismo que a secreta, dificultando a formação de nódulos. Por outro lado, em hospedeiras como *Tephrosiavogelii*essas mesmas Nops podem funcionar reprimindo a indução de uma reação de defesa da planta de maneira análoga as proteínas efetoras dos fitopatógenos, favorecendo a nodulação (KRAUSE *et al*., 2002; KRISHNAN *et al*., 2003; MARIE *et al*., 2003; VIPREY *et al*., 1998 LORIO 2004). Uma vez que a expressão do TTSS é controlada pela cascata regulatória que inclui SyrM2 (e potencialmente SyrM1), um dos potenciais causadores dos diferentes fenótipos observados nas plantas testadas, é TTSS. Diferentes plantas respondem de forma diferencial a presença ou ausência do TTSS de NGR234, sendo que outras são completamente indiferentes à sua presença (MARIE*et al*., 2003) ou respondem diferencialmente a cada um dos efetores (KAMBARA *et al*., 2009).

Em todas as plantas testadas a nodulação por NGR234 e NGRΔ*syM1* foi similar, sugerindo que SyrM1 não afeta a simbiose entre NGR234 e as espécies de planta hospedeira *Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum, Tephrosia vogelii* e *Phaseolus vulgaris*. Um experimento semelhante, realizado por Hanin e colaborados (1998), não observou nenhuma diferença significativa na nodulação de *Vigna unguiculata*(e outras nove espécies de plantas), mas indicou menor número de nódulos em *Tephrosia vogelii*(22±2 no NGR234 e 14±2 no *syrM1*) e *Macroptilium atropurpureum*(31±1 no NGR234 e 20±4 no *syrM1*). No entanto, mutações em *syrM1* de NGR234 (HANIN *et al*. 1998) ou *syrM* de *Sinorhizobiummeliloti* (BARNETT e LONG, 1990) tiveram apenas um pequeno efeito na nodulação. Uma possibilidade é que o papel biológico de *syrM1*seja apenas otimizar os fatores que controlam uma eficiente nodulação e o reconhecimento específico entre os parceiros simbióticos (HANIN *et al*., 1998).

Vários testes de nodulação visando investigar o papel do TTSS e das proteínas Nops na simbiose tem sido realizados, principalmente em *Rhizobium* sp. NGR234, *S. fredii* estirpes HH103 e USDA257, e *Bradyrhizobiumjaponicum* USDA110 (SAAD *et al.*, 2005; AUSMEES *et al*., 2004; KRAUSE *et al*., 2002; KRISHNAN *et al*., 2003; LORIO *et al*., 2004; MARIE *et al.,* 2003; VIPREY *et al*., 1998). Em NGR234, por exemplo, um TTSS funcional é necessário para a nodulação de *Tephrosia vogelii, Flemingia congesta* e *Lablab purpureus*, enquanto para *Pachyrhizus tuberosus* e *Crotalaria juncea* o TTSS parece ser extremamente deletério (AUSMEES *et al*., 2004; MARIE *et al*., 2003). Estirpes de NGR234 contendo mutações em genes que codificam Nops geralmente também induzem a formação de um grande número de nódulos em feijão. No entanto, a ausência de NopP torna a estirpe resultante menos eficiente na nodulação de feijão (KAMBARA *et al.*, 2009).

Essas respostas dependem do reconhecimento, ou não, de cada Nop pela planta. A capacidade de linhagens como *Sinorhizobiumfredii* USDA257 nodular soja é altamente específica. As cultivares Peking and Davis formam nódulos fixadores de nitrogênio normalmente, mas outras cultivares como McCall and Viçoja, por exemplo, não conseguem (HERON e PUEPPKE, 1984; BALATTI e PUEPPKE, 1992). Essa especificidade é dependente do locus *nolXWBTUV* (HERON e*t al.,* 1989; MEINHARDT *et al.,* 1993; KOVÁCS *et al.,* 1995), cuja a expressão em *Sinorhizobium fredii* é responsável pela secreção de pelo menos cinco proteínas (KRISHNAN e PUEPPKE 1993). Uma mutação em qualquer gene desse locus torna USDA257 capaz de nodular a cultivar McCall (BALATTI e PUEPPKE 1992; MEINHARDT *et al.,* 1993). Por outro lado, em HH103, a estirpe mutante *rhcJ* perde sua capacidade de realizar simbiose com as cultivares de soja Williams e Peking (LYRA *et al*., 2006).

Estudos mostraram que a inativação de*nopB* de NGR234 impede a secreção de proteínas dependentes do TTSS e afeta a nodulação de certas cultivares de feijão (KRISHNAN e PUEPPKE, 1993; MEINHARDT *et al*., 1993). Saad e colaboradores (2005) observaram que o mutante *nopB* exibiu fenótipos muito similares aqueles causados pelo mutante do TTSS NGR_*rhcN* (VIPREY *et al.*, 1998):em *Pachyrhizus tuberosus*, a ausência de NopB (e portanto de todas as Nops) aumentou o número de nódulos fixadores de nitrogênio com relação a estirpe selvagem NGR234. Já em *Tephrosia vogelii* o número de nódulos maduros foi

menor no mutante *nopB* que em NGR234. Em *Vigna unguiculata*nenhuma alteração fenotípica foi observada, sugerindo que nessa leguminosa ambos os ativadores SyrM1 e SyrM2 não afetam a simbiose. Alguns trabalhos também demonstraram em *Vigna unguiculata*aausência de diferença fenotípica entre a nodulação produzida pela estirpe mutante para NopB e pela estirpe selvagem em USDA257 (LORIO *et al*., 2004) e em NGR234 (SAAD *et al*., 2005). Com base nesses dados é possível sugerir que *Vigna unguiculata* não responde ao TTSS.

Assim, o TTSS dos rizóbios desempenha um importante papel na nodulação, podendo atuar como determinante da especificidade dos hospedeiros (VIPREY *et al.*, 1998). As observações de que*Phaseolus vulgaris* é sensível ao TTSS funcional e à secreção de NopB em NGR234, bem como, de que as demais plantas testadas requerem a ação de NopB e do TTSS para uma nodulação eficiente com NGR234, estão de acordo com os estudos citados anteriormente. Dessa forma, é possível fazer uma correlação dos resultados obtidos no ensaio de nodulação com aqueles observados nos ensaios de expressão gênica, de modo que quando o ativador transcricional SyrM2 está presente ocorre aumento da expressão de NopB e o TTSS funciona normalmente, mas quando *syrM2* está mutado, os níveis de secreção de NopB são baixos e isso compromete o TTSS, levando a um aumento no número de nódulos nas raízes de algumas plantashospedeiras e diminuindo a nodulação em outras. A ausência de fenótipo provocado pelo mutante para *syrM1* também está de acordo com o resultado obtido no ensaio de expressão gênica, de que SyrM1 não induz a transcrição de *nopB*, e dessa forma não desempenha um papel central na regulação de TTSS nem na nodulação. No entanto, é importante lembrar que o TTSS não é o único componente envolvido na nodulação. Outras moléculas e estruturas presentes nos rizóbios também são importantes para o reconhecimento desses organismos pelas plantas hospedeiras e também podem ser capazes de alterar o fenótipo de nodulação, tais como ospolissacarídeos extracelulares (EPS),também denominados exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e β-glicanos cíclicos,além dos fatores Nod, que são necessários para o desenvolvimento contínuo do cordão de infecção.

O experimento de nodulação realizado no presente trabalho também mostrou que o efeito exercido por SyrM1 e SyrM2 de NGR234 não depende se o nódulo formado pela leguminosa é determinado (*Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum* e *Phaseolus vulgaris*) ou indeterminado (*Tephrosia vogelii*). Baena e

colaboradores (2008),também observou que a influencia das Nops de *Sinorhizobium fredii* HH103 na nodulação de plantas hospedeiras não está relacionada com o formato do nódulo.

Além dos efeitos isolados de SyrM1 e SyrM2 no fenótipo de nodulação por NGR234, Hanin e colaboradores (1998) sugeriram que *syrM*2 pode mascarar ou complementar a função de *syrM*1. Para testar uma possível ação conjunta de SyrM1 e SyrM2 na nodulação de NGR234 em *Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum, Tephrosia vogelii* e *Phaseolus vulgaris*, estas plantas foram inoculadas com o mutante duplo para ambos os genes (NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*). Em *M. atropurpureum,* NGRΔ*syrM1*/Δ*syM2* apresentou padrão de nodulação semelhante a NGRΔ*syM2,*sugerindo que este fenótipo é devido à falta de SyrM2 e não de SyrM1.

Curiosamente, em *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosiavogelii* e *Vigna unguiculata*é provável que ocorra uma complementação das atividades de SyrM1 e SyrM2 que é hospedeiro-específica. Em *Phaseolusvulgaris*, o mutante duplo para *syrM1* e *syrM2* apresentou um fenótipo intermediário entre aqueles observados em NGRΔ*syrM2* e NGR234. Uma possível explicação para isso seria o fato de *syrM2* desempenhar uma função que diminuísse o número de nódulos enquanto *syrM1* desempenhasseum papel benéfico para a nodulação, mas que apenas pode ser observado na ausência de SyrM2. Dessa forma, a estirpe NGRΔ*syrM1* teria o mesmo fenótipo que a estirpe selvagem, devido a presença de SyrM2 com efeito negativo sobre a nodulação; NGRΔ*syrM2* teria uma nodulação muito melhor que as demais estirpes, pois além de não apresentar o efetor negativo (SyrM2) ainda possui o efetor positivo (SyrM1); e por fim, NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2* teria um fenótipo intermediário por não ter sua nodulação prejudicada por SyrM2, mas também não ser beneficiado por SyrM1. Já em *Tephrosia vogelii,* ambos os ativadores SyrM1 e SyrM2 devem possuir efeito positivo para a nodulação, sendo a ação de SyrM1 mascarada por SyrM2. Isso explicaria o fato da nodulação nas plantas inoculadas com as estirpes NGR234 e NGRΔ*syrM1* serem semelhantes e apresentarem menor número de nódulos que a aquelas inoculadas com NGRΔ*syrM2*, que por sua vez apresentam nodulação não tão eficiente quanto as plantas cultivadas com a estirpe NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2*, onde ambos SyrM1 e SyrM2 estão ausentes. Contudo, para a confirmaçãodessas hipóteses é necessária a realização depelo menos mais uma repetição do ensaio de nodulação, se possível com maior número de plantas por

grupo, visando diminuir a variação amostral observada e confirmar os resultados observados, embora todos eles tenham sido testados estatísticamente.

6. **CONCLUSÕES**

As observações realizadas permitiram concluir que a ação do ativador transcricional SyrM2 nos alvos testados é dependente de flavonoides e *nodD1*. SyrM2 parece estar diretamente envolvido na ativação de *y4xD* e *nodD2*, através do reconhecimento e interação com a região regulatória desses genes. Na presença de flavonoides, a expressão de *y4xD* é totalmente dependente de SyrM2, enquanto *nodD2*pode ser expresso, em baixos níveis, mesmo na ausência desse indutor. SyrM2 também aumenta a expressão de *nopB*, mas de forma indireta e tardia. É possível que SyrM2 desempenhe esse papel através de TtsI, um regulador chave na transcrição de *nopB*.

SyrM1 não parece estar envolvida na regulação de *nodD2*, mas pode desempenhar uma atividade repressora em*y4xD* e *nopB*, que atenua os níveis de expressão desses genes. Essa ação de SyrM1 sobre a regulação de *y4xD* e *nopB* não deve ocorrer diretamente, mas através de sua interação com outro *syrM-box*.

Nenhuma influencia de flavonoides, NodD1, SyrM1 ou SyrM2 foi verificada sobre a regulação dos genes *rhcC1* e *nodPQ,* que parecem ser constitutivamente expressos.

Quanto à influência de SyrM1 e SyrM2 no fenótipo de nodulação foi observado que a ausência de SyrM2 provoca uma resposta hospedeiro-específica que aumenta o número de nódulos nas raízes de *Phaseolusvulgaris* e diminui a nodulação em *Tephrosia vogelii*e*Macroptiliumatropurpureum*.SyrM1 sozinha não é capaz de produzir nenhum efeito fenotípico significativo nas plantas testadas, sugerindo pouca ou nenhuma atividade desse regulador. No entanto, em algumas plantas SyrM1 pode agir em conjunto com SyrM2, afetando assim a nodulação. Em *Phaseolusvulgaris*, SyrM1 parece ter um efeito benéfico para a nodulação, mas que é bloqueado por SyrM2. Outro tipo de complementação entre *syrM1* e *syrM2* foi observada em *Tephrosia vogelii,* onde ambos os ativadores SyrM1 e SyrM2 devem possuir efeito positivo para a nodulação, sendo a ação de SyrM1 mascarada por SyrM2.A nodulação em *Vigna unguiculata* não é afetada pelos ativadores SyrM1 e/ou SyrM2.

Por fim, a análise de expressão gênica possibilitou elucidar alguns passos da cascata regulatória que envolve os ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2. O

ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) e o experimento de fenótipo de nodulação também foram importantes na confirmação de alguns dados referentes à atividade desses reguladores simbióticos. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho desvendaram apenas uma pequena parte da complexa cascata regulatória que envolve SyrM1 e SyrM2, existindo ainda muito conhecimento a ser descoberto com relação a esses ativadores transcricionais. A investigação da função do gene hipotético *y4xD*, a análise da sequência específica que é reconhecida por SyrM2 na região regulatória de *y4xD*, a busca por novos *syrM-box* e genes alvo da regulação por SyrM1 e SyrM2, tal como *noeE*, e a interação entre esses e outros reguladores, são poucos exemplos do muito que ainda pode ser pesquisado nessa área.

REFERÊNCIAS

ALFANO, J.R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, v**.** 179, p. 5655-5662, 1997.

AUMEES, N. *et al.* Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Bacteriology**,v.186**,** p.4774-4780, 2004.

BALATTI, P. A.; PUEPPKE, S. G. Identification of North American soybean lines that form nitrogen-fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA257. **Canadian Journal of Plant Science**,v.72*,* p*.* 49-55, 1992.

BARNETT, M.J.; LONG, S.R. DNA sequence and translational product of a new nodulation regulatory locus: SyrM has sequence similarity to NodD proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3695-3700, 1990.

BARNETT, M.J. *et al*. Transcription start sites for *syrM* and *nodD3* flank insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti.* **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1782-1787, 1996.

BARNETT, M. J.; LONG, S. R. Identification and Characterization of a Gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p.550–559, 1997.

BARNETT, M.J.; SWANSON, J.A.; LONG, S.R. Multiple Genetic Controls on *Rhizobium meliloti syrA*, a Regulator of Exopolysaccharide Abundance**. Genetics Society of America**, v. 148**,** p.19–32, 1998.

BARNETT, M.J. *et al*. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 9883–9888, 2001.

BARNETT, M. J. *et al*. 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 the United States of America**, v. 101, p.16636-16641, 2004.

BARTSEV, A. V. *et al.* Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. **FEBS Letters**, v.554, p.271–274, 2003.

BARTSEV, A.V. *et al*. NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. **Plant Physiology**, v. 134, p. 871-879, 2004.

BEGUM, A. A. *et al*. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and

preactivated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1537-1543, 2001.

BENDER, G.L. *et al*. The *nodD*1 gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the non legume *Parasponia*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.1, p. 259-266, 1988.

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

BROUGHTON, W.J. *et al.* Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. **The Journal off Cell Biology**, v102, p.1173-1182, 1986.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5641-5652, 2000.

BROUGHTON, W.J. *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.

BROWNING, D.F.; BUSBY, S.J.W. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 1-9, 2004.

CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D.K.; BAUER, W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3164-3169, 1988.

CAPELA, D.; CARRERE, S.; BATUT, J. Transcriptome-based identification of the *Sinorhizobium meliloti nodD1* regulon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4910-4913, 2005.

CHEN, X.C. *et al*. Modulating DNA bending affects NodD mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum.* **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2540–2548, 2005.

COOPER, J.E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 1355-1365, 2007.

CRONAN, G. E.; KEATING, D. H. *Sinorhizobium meliloti* sulfotransferase that modifies lipopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p.4168-4176, 2004.

DEAKIN, W. J. *et al*. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p. 499-507, 2005.

DEAKIN, W. J; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Review Microbiology**, v. 7, p. 312-320,

2009.

DE LYRA, M. do C. *et al*. Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. **International Microbiology**, v. 9, p. 125-133, 2006.

DEMONT, N. *et al*. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors *N*-acylated by (w-1)-hydroxylated fatty acids. **The Embo Journal**, v. 13, p.2139-2149, 1994.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 497-531, 1992.

D'HAEZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v. 12, p. 79R–105R, 2002.

DITTA, G. *et al.* Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7347-7351, 1980.

DUSHA, I. *et al*. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes *(nodABC)* are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. **Molecular and General Genetics**, v. 219, p. 89-96, 1989.

FELLAY, R. *et al*. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 16, p. 657-667, 1995.

FELLAY, R. *et al*. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of *nodABC* operon. **Molecular Microbiology**, v. 27, p. 1039-1050, 1998.

FISHER, R.F.; LONG, S.R. Interactions of NodD at the *nod-box*: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 233, p. 336–348, 1993.

FREIBERG, C. *et al*. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, 1997.

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, p. 280–300, 2004.

GIBSON, K.E.; KOBAYASHI, H.; WALKER, G.C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 413–441, 2008.

GONZÁLEZ, V. *et al*. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. **Genome Biology**, v.4, p. R36, 2003.

GÖTTFERT, M.; GROB, P.; HENNECKE, H. Proposed regulatory pathway encoded

by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 2680-2684, 1990.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, p. 293–96, 2008.

GYORGYPAL, Z.; IYER, N.; KONDOROSI A. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid–specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. **Molecular and General Genetic**, v. 212, p. 85-92, 1988.

HANIN, M. *et al*. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulfated Nod factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 343-350, 1998.

HERON, D.S.; Pueppke, S.G. Mode of infection, nodulation specificity, and indigenous plasmids of 11 fast growing *Rhizobium japonicum* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 160, p.1061-1066, 1984.

HERON, D. S. *et al*. Nodulation mutants of *Rhizobium fredii* USDA257. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 2, p.4-10, 1989.

HU, H. *et al*. In *Rhizobium leguminosarum*, NodD represses its own transcription by competing with RNA polymerase for binding sites. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 2784-2793, 2000.

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

JONES, K. M. *et al*. How rhizobial symbionts invade plants: the *Shinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 619-633, 2007.

KAMBARA, K. **Regulation and effects of the type-three secretion system of *Rhizobium* species NGR234**. Tese (Docteur ès sciences) – Faculdade de ciências,Universidade de Genebra, Suíça, 2008.

KAMBARA, K. *et al*. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. **Molecular Microbiology**, v. 71, p. 92–106, 2009.

KANEKO, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research***,* v. 7, p. 331–338, 2000.

KEATING, D.H. *Sinorhizobium meliloti* SyrA Mediates the Transcriptional Regulation of Genes Involved in Lipopolysaccharide Sulfation and Exopolysaccharide Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 2510–2520, 2007.

KNIGHT. C. *et al*. Nodulation inhibition by *Rhizobium leguminosarum* multicopy

nodABC genes and analysis of early stages of plant infection. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 552-558, 1986.

KOBAYASHI, H. *et al*. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 335-347, 2004.

KONDOROSI, E. *et al*. Involvement of the *syrM* and *nodD*3 genes of *Rhizobium meliloti* in *nod g*ene activation and in optimal nodulation of the plant host. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 3035-3048, 1991.

KOVÁCS, L.G. *et al*. Transcriptional organization and expression of *nolXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. **Molecular Microbiology**, v. 17, p. 923–933, 1995.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GÖTTFERT, M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 15, p. 1228–1235, 2002.

KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 6, p. 107-113, 1993.

KRISHNAN, H. B. NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 831–839, 2002.

KRISHNAN, H.B. *et al*. 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 Interact**, v. 16, p. 617–625, 2003.

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

LOH, J. *et al*. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene encodes three functionally distinct proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1544–1554, 1999.

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

LONG, S.R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1885-1898, 1996.

LÓPEZ-BAENA, F.J. *et al*. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. **Microbiology**, v. 154, p. 1825-1836, 2008.

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 Interact**, v. 17, p. 1259-1268, 2004.

MACHADO, D. *et al*. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 375-382, 1998.

MADDOCKS, S.E.; OYSTON, P.C.F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiology**, v. 154, p. 3609-3623, 2008.

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

MARIE, C. *et al*. Characterisation of Nops, Nodulation Outer Proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 16, p. 743-751, 2003.

MARIE, C. *et al*. 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 Interact**,v. 17, p. 958-966, 2004.

MEINHARDT, L.W. *et al*. Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 17-29, 1993.

MERGAERT, P.; MONTAGU, M.V.; HOLSTERS, M. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 811-817, 1997.

MICHIELS, J.; DE WILDE, P.; VANDERLEYDEN, J. Sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli syrM* gene. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3893, 1993.

MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Genetics**, v. 122, p. 7-18, 1989.

PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Rhizobial and actinorhizal symbiosis: what are the shared features? **The Plant Cell**, v. 8, p. 1899-1913, 1996.

PECK, M.C.; FISHER, R.F.; LONG, S.R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 5417-5427, 2006.

PERRET, X. *et al*. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of the *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 415-425, 1999.

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

2000.

PHILLIPS, D.A.; STREIT, W. Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. **Plant-microbe interactions**,v. 1, p. 236-271, 1996.

PINHEIRO, F.C. **Análise de expressão dos ativadores de transcrição SyrM1, SyrM2, NodD1, NodD2 e TtsI de *Rhizobium* sp. NGR234.** 93 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

POSTGATE, J.R.**The fundamentals of nitrogen fixation.** Cambridge: Cambridge University Press,1982.

POUPOT, R. *et al*. *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate. **FEBS Letters**, v. 368, p. 536-540, 1995.

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

RAMU, S.K.; PENG, H.M.; COOK, D.R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 15, p. 522-528, 2002.

REDDY, P. M. et al. Flavonoids as Signaling Molecules and Regulators of Root Nodule Development.**Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 1, p. 83-94, 2007.

RELIC, B. *et al*. *nod* genes and Nod factors of *Rhizobium* species NGR234. InPALACIOS, R.; MORA, R.; NEWTON, W. E. **New Horizons in Nitrogen Fixation.** Kluwer Academic Publishers, 1993, p. 183-189,

ROCHE, P. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 15305-15310, 1996.

SAAD, M.M. *et al*. NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v.187, p. 1173-1181, 2005.

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

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

SCHELL, M. A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 597-626, 1993.

SCHMEISSER, C. *et al*. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4035-4045, 2009.

SCHMIDT, P.E.; BROUGHTON, W.J.; WERNER, D. Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 384-390, 1994.

SCHWEDOCK, J.; LONG, S. R. ATP sulphurylase activity of the *nodP* and *nodQ* gene products of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, v. 348, p.644-647, 1990.

SCHWEDOCK, J. S. *et al*. *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ form a multifunctional sulfate-activating complex requiringGTP for activity. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.7055-7064, 1994.

SCHWEDOCK, J. S.; LONG, S. R. *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: the two copies of *nodPQ* and a new locus, *saa*. **Genetics**, v.132, p.899-909, 1992.

SHARMA, S. B.; SIGNER, E. R. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in plant revealed by transposon Tn*5-gusA*. **Genes e Development**, v. 4, p.344-356, 1990

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, p.784-791, 1983.

SKORPIL, P. *et al*. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii.* **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1304-1317, 2005.

SMITH, L.S.; LONG, S.R. Requirements for *syrM* and *nodD* genes in the nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti* 1021. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 937-940, 1998.

SNOECK, C. *et al*. *Rhizobium* sp. BR816 produces a complex mixture of known and novel lipochitooligosaccharide molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 678-684, 2001.

SNOECK, C. *et al*. Identification of a Third Sulfate Activation the CysDN Sulfate Activation Complex System in *Sinorhizobium* sp. Strain BR816.**Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2006-2014, 2003,

SOTO, M.J.; SANJUÁN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, v.152, p. 3167-3174, 2006.

SWANSON, J.A.; MULLIGAN, J.T.; LONG, S.R. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti.* **Genetics**, v. 134, p. 435-444, 1993.

THEUNIS, M. *et al.* 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, p. 1153-1161, 2004.

TRINICK, M.J. Relationship amongst the fast-growing *Rhizobium* of *Lablab purpureus, Leucaena leucocephala, Mimosa* sp., *Acacia farnesiana,* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other *Rhizobium* groups. **Journal Apllied Bacteriology**, v. 49, p. 39-53, 1980.

VAN BRUSSEL, A.A.N. *et al*. A biovar-specific signal of *Rhizobiumleguminosarum*bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. nigra. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 5394-5401, 1990.

VANCE, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, p. 390-397, 2001.

VIPREY, V. *et al*. Simbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

WAIS, R.J.; KEATING, D.H.; LONG, S.R. Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 211-224, 2002.

WANG, S.P.; STACEY, G. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod-b*ox. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p.3356-3365, 1991.

WASSEM, R. *et al*. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts-boxes*. **Molecular Microbiology**, v. 68, p. 736-748, 2008.

APÊNDICES

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....76
1. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....76
1.1. Extração de DNA plasmidial.....76
1.2. Extração de DNA genômico de *Rhizobium*sp. NGR234.....76
1.3. Extração de DNA de gel de agarose.....77
1.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.....77
1.5. Eletroforese de DNA em gel agarose.....80
1.6. Marcação de DNA com fosfato radioativo.....80
2. CONFIRMAÇÃO DE ESTIRPE MUTANTE POR HIBRIDIZAÇÃO.....80
3. CULTIVO DAS ESTIRPES BACTERIANAS.....81
3.1. Cultivo em meio seletivo.....81
3.2. Preparo de células competentes.....83
3.2.1 Preparo de células quimicamente competentes.....84
3.2.2. Preparo de células eletrocompetentes.....84
3.3. Transformação de célula quimicamente competente.....84
3.4. Transformação por eletroporação.....85
3.5. Conjugação.....85
4. SUPER-EXPRESSÃO PROTEICA.....85
5. SOLUBILIZAÇÃO PROTEICA.....86
5.1. Solubilização proteica em pequena escala.....86
5.2. Solubilização proteica em grande escala.....86
5.3. Sobilização de proteínas a partir de corpos de inclusão.....87
6. PURIFICAÇÃO PROTEICA.....87
6.1. Purificação em coluna de afinidade Hi-Trap Chelating (GE).....87
6.2. Purificação em coluna de heparina.....88
7. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE).....88
8. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA).....88
9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....89
10. ANÁLISE DO FENÓTIPO DE NODULAÇÃO.....90
APÊNDICE 2 – CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES.....91
2.1. Construção do mutante ngr∆*syrM1*.....91
2.2. Construção do mutante ∆*syrM2*.....93
2.3. Construção do mutante duplo ngr∆*syrM1*∆*syrM2*.....94
APÊNDICE 3 –CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE*y4xD*, *nopB*,*rhcC1* E *nodPQ* COM *gfp*.....95
APÊNDICE 4 –CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PET28-*syrM1* E PET28-*syrM2*......98
APÊNDICE 5 –EXPRESSÃO, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO SyrM1-HIS E SyrM2-HIS.....100
ANEXOS.....104

APÊNDICE 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

1. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

1.1.Extração de DNA plasmidial

A técnica de lise alcalina (mini-prep) foi utilizada para extração de DNA plasmidial conforme Sambrook, *et al.* (1989). Para isso 1,5 mL de cultura foi centrifugada por um minuto a 13000 rpm (mini spin Eppendorf), o meio de cultura foi descartado e o precipitadoressuspenso em 150 µL de GET (Glicose - 50,0 mM, Tris HCl pH 8,0 - 25,0 mM, EDTA pH 8,0 - 10,0 mM) com o auxílio do vortex. As células foram lisadas através da adição de 150 µL de solução de lise (NaOH 0,2M e SDS 1%) que foi homogeneizada cuidadosamente por inversão e deixada agir por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL de Kacf (acetato de Potássio 3M; ácido fórmico 1,8M), a solução foi novamente homogeneizada gentilmente e incubada no gelo por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 50 µL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e esta foi vigorosamente homogeneizada (3 segundos no vortex) e então centrifugada a 14500 rpm (mini spin Eppendorf) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e precipitado com 1mL de etanol puro. Após 10 minutos de centrifugação a 14500 rpm, o *pellet* foi lavado com etanol 80% e centrifugado por mais 5 minutos. O DNA plasmidial foi deixado secar e dissolvido em 15 µL de água Mili-Q estéril.

1.2. Extração de DNA genômico de *Rhizobium*sp. NGR234

Para obtenção de DNA cromossômico total de *Rhizobium* sp.NGR234, 3 mL de cultura foram centrifugadas por 2 minutos a 13000rpm(mini spin Eppendorf) e o *pellet* formado foi ressuspenso em 100 µL de GET (Glicose - 50,0 mM, Tris HCl pH 8,0 - 25,0 mM, EDTA pH 8,0 – 10 mM) por agitação no vortex. A suspensão celular foi então incubada com 10 µL de lisozima (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente 400 µL de tampão de lise (40 mM Tris-acetato pH 7,8, 20 mM acetato de Na, 1 mM EDTA e 1% SDS) foi adicionado e a mistura foi homogeneizada vigorosamente por pipetagem até a viscosidade ter diminuído

significativamente. Em seguida foram adicionados 165 μL de NaCl 5 M à solução e esta foi bem homogeneizada antes de serem adicionados 200 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Uma nova homogeneização foi realizada e a mistura foi centrifugada por dez minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado e tratado novamente com 50 μL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Por último ainda foi realizado um tratamento com 50 μL de clorofórmio a fim de se obter um DNA mais puro. Ao sobrenadante foi então adicionado 2/3 de volume de acetato de amônio 7,5M e 2,5 volumes de etanol. A solução foi homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 14500 rpm. O *pellet* foi lavado com etanol 80% e seco antes de ser dissolvido em água Mili-Q estéril.

1.3. Extração de DNA de gel de agarose

Quando necessário, fragmentos de DNA foram separados através de eletroforese em gel de agarose e purificados para posterior utilização. Para isso foram aplicados no gel, ao lado do DNA a ser purificado, o marcador de massa molecular (1 kb Ladder) e uma alíquota da amostra de interesse. Após o término da corrida apenas o marcador e a pequena alíquota foram corados com brometo de etídeo. A linha do gel contendo a amostra a ser purificada foi recortada na mesma altura da banda de interesse visualizada na alíquota que foi corada. Dessa forma evitou-se a contaminação do DNA de interesse com o corante.

A purificação dessas amostras provenientes de gel de agarose, assim como amostras de PCR e restrições de DNA foram realizadas com Kit illustra^{TM} GFX^{TM}(GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. Esse kit fornece uma coluna composta por uma membrana de sílica na qual qualquer DNA com tamanho entre 50pb e 10kb permanece ligado e pode ser lavado antes de ser eluído.

1.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando o método de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) em sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems). O DNA molde utilizado compreendeu plasmídeos extraídos por lise alcalina (mini-prep) que foram tratados por 3 horas a 37°C com RNAse

(10µg/mL), precipitados com 2/3 de volume de acetato de amônio 7,5M e 2 volumes de etanol puro, lavados com etanol 80%, deixados secar e dissolvidos em 8 µl de água Mili-Q estéril. Além do molde, as reações de sequenciamento foram montadas com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), que contém dideoxinucleotídeos fluorescentes, e com apenas um dos oligonucleotídeos iniciadores Universal ou Reverso, que anelam próximo ao sítio de policlonagem dos plasmídeos utilizados e permitem o sequenciamento do inserto de interesse. As condições de amplificação foram: 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento igual a 50°C por 15 segundos e tempo de extensão de 2 minutos a 60°C.

As reações em cadeia da DNA polimerase (PCR) foram realizadas em termocicladores Mastercycler Eppendorf e planejadas para cada caso específico, variando principalmente o tempo de extensão de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado e a temperatura de anelamento de acordo com cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados (quadro 1).

QUADRO 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS.

Pares de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura anelamento	Amplificação
syrM2N: 5'AATGGATCAGCCCGCTTGGA3' **syrM2C:** 5'ACTATCGTTCTGCCGCCTCG3'	60°C	Região codificante de *syrM2*
syrM1N: 5'CGTGGATGAGCCCGCTTGTA3' **syrM1C:** 5'TTGCCTGGACGCAGCATCG3'	60°C	Região codificante de *syrM1*
NB19+:5'ATAGAGATCTGCAACGAGCACACG3' **NB19-:**5'CCAAGAGATCTGATCCATTGATGTC3'	60°C	Região regulatória de *syrM2*
syrM1up: 5´GTGCACTGCAGCAATCAG3´ **syrM1C:** 5'TTGCCTGGACGCAGCATCG3'	58°C	Regiões promotora e codificante de *syrM1*
NB19+:5'ATAGAGATCTGCAACGAGCACACG3' **syrM2C:** 5'ACTATCGTTCTGCCGCCTCG3'	68°C	Regiões promotora e codificante de *syrM2*
ttsIdown:5´-CCAACGAATTCAACGGCAA-3´ **NB18for:**5'TAACGGCAAAGCAGTGTGCGA3'	62°C	Região Nod-Box 18 localizado a montante do gene *ttsI.*
syrM1NdeI:5'GGAGAGGCATATGGATGAGCC3' **syrM1EcoRI:** 5'CGGCCAGAATTCGGACTCA3'	60°C	Região codificante de *syrM1* com inserção de sítios NdeI/EcoRI
syrM2NdeI:5'AGAAGACACATATGGATCAGCCC3' **syrM2HindIII:**5'TTCGCTGCAAGCTTCCGTT3'	60°C	Região codificante de *syrM2* com inserção de sítios NdeI/HindIII
y4xDfor: 5'ACCGCCTGGATCCCGAAA3' **y4xDrev:** 5'AAACCGGAGCTCAGATAACGC3'	60°C	Região promotora de *y4xD*com inserção de sítios BamHI/SacI
nodPQfor: 5'TGAGGTGGATCCGCAGTCG3' **nodPQrev:** 5'CGAGTAGAGCTCAACCGGGTT3'	60°C	Região promotora de *nodPQ*
nopBrev: 5'CCATTATAAGGATCCCGCAGAC3' **rhcC1rev:**5'GACACATAGAGCTCAACCCCGTC3'	60°C	Região promotora de *nopB/rhcC1*
nopBup:5'CTCGTCTTGATAAACCAAATCTGAA3' **nopBrev:** 5'CCATTATAAGGATCCCGCAGAC3'	60°C	Parte da região intergênica de *nopB/rhcC1* e parte da região codificante de *nopB*
nopBup:5'CTCGTCTTGATAAACCAAATCTGAA3' **nopBdown:**5'GTCAAAGAGTTAAGTAATCGAGTCC3'	60°C	Região intergênica de *nopB/rhcC1*
nopBdown:5'GTCAAAGAGTTAAGTAATCGAGTCC3' **rhcC1rev:**5'GACACATAGAGCTCAACCCCGTC3'	60°C	Parte da região intergênica de*nopB/rhcC1*
GFP5'R1:5´CAAGAATGGGGACAACTCC3	58°C	Sítio de policlonagem do vetor pPROBE-GT.

FONTE: O autor.

1.5. Eletroforese de DNA em gel agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para visualizar amostras de plasmídeos, fragmentos de restrição e produtos de PCR. O tampão de corrida utilizado para cobrir o gel e permitir a passagem da corrente elétrica foi TBE 1x (90 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA). A concentração do gel variou entre 0,7 e 1% de acordo com o tamanho do DNA analisado e a voltagem aplicada variou entre 60 e 80V de acordo com a cuba utilizada. Após o término da corrida o gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 μg/mL, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema de fotodocumentação AlphaImager® Mini (Alpha Innotech).

1.6. Marcação de DNA com fosfato radioativo

As sequências gênicas contendo o *syrM-box* localizado na região regulatória de *nodD2* e a região regulatória de *y4xD* foram marcadas radioativamente através de ɣ-^{32}P ou α-^{32}P.

Amarcação com ɣ-fosfato consiste na utilização de [ɣ-^{32}P]-ATP como substrato para uma polinucleotideo quinase do bacteriófago T4, que catalisa a transferência de ɣ-fosfato do ATP para a extremidade 5'-OH do DNA molde, gerando um oligonucleotídeo 5'-[32P]-fosfato marcado. Dessa forma um oligonucleotideo do par de primers que amplifica a sequencia de interesse foi marcado com P^{32} e utilizado numa PCR que resultou no DNA alvo marcado. Já a marcação do DNA de interesse com α-^{32}Pfoi realizada através daincorporação de dCTP-^{32}P na molécula durante a amplificação da sequência alvo. Todos os fragmentos de DNA alvo produzidos foram purificados para remover os componentes da reação.

2. CONFIRMAÇÃO DE ESTIRPE MUTANTE POR HIBRIDIZAÇÃO

Para confirmar a mutação do gene *syrM1,* amostras do DNA genômico da estirpe selvagem e dos possíveis mutantes NGRΔ*syrM1* e NGRΔ*syrM1*:Δ*syrM2* foram digeridos com a endonuclease *Sac*I. Para confirmar a mutação de *syrM2* o DNA genômico das possíveis estirpes NGRΔ*syrM2*, NGRΔ*syrM1*/Δ*syrM2,* bem como de NGR234 foram digeridas com a enzima *Eco*RI. As amostras clivadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TBE. Após a corrida

o gel foi tratado sucessivamente com as seguintes soluções: 10 minutos em solução de depurinação (0,25 M de HCl), 15 minutos em solução de desnaturação (1,5 M de NaCl e 0,5 M de NaOH), 15 minutos em solução de neutralização (1,0 M de Tris pH 7,5 e 1,5 M de NaCl) e 20 minutos em solução de transferência SSC 20x (3,0 Mde NaCl e 0,3 M de citrato trissódico pH 7,2). Após isso, os fragmentos de DNA foram transferidos do gel para uma membrana de nylon Hybond^{TM}-N^{+} (Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridade, num processo que durou aproximadamente 48 horas. O DNA foi então fixado à membrana através de exposição à luz ultravioleta (312 nm) por cinco minutos.

As sondas foram construídas através da amplificação de um fragmento de 1000 pb, referente a região promotora de *syrM1* (com o par de oligonucleotídeos iniciadores *syrM1up*/*syrM1down),*e através da amplificação da região codificadora de *syrM2,* que também possui cerca de 1000 pb (com os primers *syrM2C*/*syrM2N)*. Ambas as sondas foram marcadas radioativamente, conforme item 1.6.

Primeiramente a membrana foi submetida a uma pré-hibridização por 15 minutos a 65°C com solução bloqueadoracontendo SDS 2% em tampão fosfato 0,5M pH 8,0. Em seguida foi adicionado 20 ng/ml de DNA sonicado de esperma de salmão (Sigma Chemical Company) e o sistema foi incubado por 4 horas a 60°C sob agitação constante (0,5-1,0 rpm) em forno de hibridização. Antes de ser adicionado à membrana pré-hibridizada, a sonda marcada com ^{32}P foi desnaturada por aquecimento (5 minutos a 100°C) e resfriada em banho de gelo. A mistura de hibridização foi então incubada durante 24 horas a 65°C, com agitação contínua (0,5-1,0 rpm). Por fim, a membrana foi lavada em condição de alta estringência [SSC 0,1X, SDS 0,1% a 65°C por 30 minutos], seca, exposta a uma tela de captura durante no mínimo 4 horas, e então escaneada com STORM Molecular Dynamics PhosphoImager (Amersham Biosciences).

3. CULTIVO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

3.1. Cultivo em meio seletivo

As estirpes de *Rhizobium*sp. NGR234 foram cultivadas a 28°C em meio TY (*tryptone-yeast*) sólido ou nos meios líquidos TYou RMS (meio mínimo).As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C em meio líquido Luria Bertani (LB) ou

meio sólido Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK *et al*., 1989). As culturas líquidas tanto para *E. coli* como para *Rhizobium* foram mantidos sob agitação constante a 120 rpm.

Para ambos os microorganismos os meios foram suplementados com antibióticos específicos, de acordo com a marca de resistência carregada por cada estirpe.Quando utilizados, os antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: gentamicina (Gm) 15 μg/mL; espectinomicina (Spm) 50 μg/mL; canamicina (Km); 50 μg/mL. Ampicilina; (Amp) 250 μg/mL; estreptomicina (Sm) 10 μg/mL. Além desses, nos meios seletivos para *Rhizobium* sempre foi adicionado rifampicina (Rif) 100 μg/mL ou 50 μg/mL.

Para fazer a seleção de colônias que adquiriram o inserto clonado no plasmídeo pTZ57R/T foram adicionados X-gal 30 μg/mL e IPTG 100 μM ao meio de cultura sólido.

Todas as estirpes foram armazenadas em glicerol 50% a -20°C.

As estirpes e plasmídeos utilizados são mostradas nos quadros 2 e 3 respectivamente.

QUADRO 2 - ESTIRPES UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.

Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Referência
Escherichia coli BL21 (λDE3)	Estirpe produtora da RNA polimerase do fago T7. Esta estirpe não expressa as proteases lon e OmpT e é indicada para a expressão de proteínas recombinantes.	NOVAGEN
Escherichia coli DH10B	F$^-$ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80d*lacZ* ΔM15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139* Δ(*ara leu*)7697 *galU galKrpsL endA1 nupG*	INVITROGEN
Escherichia coli S17.1	Sm^R Spm^R Tra$^+$ *pro his rec*A *hsd*R (RP4-2 kan::Tn7 tet;Mu, integrado no cromossomo)	SIMON; PRIEGER; PUHLER, 1983
Rhizobium sp. NGR234	Rif^R derivado do tipo selvagem de NGR234	LEWIN *et al*., 1990
Rhizobium sp. NGRΩ*nodD1*	NGR234 com um cassete Ω Spm no sítio *Bam*HI de *nodD1,* Spm^R.	RELIĆ *et al*., 1993
Rhizobium sp. NGRΔ*syrM1*	Mutante de NGR234 onde um fragmento de 1160pb, incluindo parte das regiões regulatória e codificante de *syrM1* foi deletado.	ESTE TRABALHO
Rhizobium sp. NGRΔ*syrM2*	Mutante de NGR234 onde um fragmento de 880pb, incluindo parte das regiões regulatória e codificante de *syrM2* foi deletado.	ESTE TRABALHO
Rhizobium sp. NGRΔ*syrM1*Δ*syrM2*	Mutante de NGR234 onde tanto syrM1 quanto syrM2 tiveram parte de suas sequências regulatória e	ESTE TRABALHO

	codificante deletadas.	

FONTE: O autor.

QUADRO 3 - PLASMÍDEOS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.

Plasmídeos	**Genótipo/Fenótipo**	**Fonte/Referência**
pET-28a (+)	Vetor de super-expressão/promotor T7. Utilizado para gerar proteínas de fusão His-Tag. Km^R.	NOVAGEN
pET-28-syrM1	Contém o gene *syrM1* (1000 pb) clonado (*Nde*I/*Eco*RI) no vetor pET-28 a(+).	ESTE TRABALHO
pET-28-syrM2	Contém o gene *syrM2* (1000 pb) clonado (*Nde*I/*Hind*III) no vetor pET-28 a(+).	ESTE TRABALHO
pGEM-3Zf	Vetor de clonagem. Amp^R	PROMEGA
pGEM-*syrM1*cvsup	Região codificante e promotora do gene *syrM1* (1.9Kb) clonada no vetor pGEM-T.	PINHEIRO, 2009
pK18*mobsacB*	Vetor mobilizável que contém o gene *sacB*. Km^R	SCHÄFER *et al*., 1994
pK18-Δ*syrM1*	Contém parte do gene *syrM1* (760 pb) clonado (*Eco*RI/*Eco*RI) no vetor pK18*mobsacB*.	ESTE TRABALHO
pK18-Δ*syrM2*	Contém parte do gene *syrM2* (960 pb) clonado (*Xba*I/*Hind*III) no vetor pK18*mobsacB*.	ESTE TRABALHO
pPROBE - GT	Vetor de clonagem contém o gene *gfp* sem promotor.Gm^R.	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000.
pPROBE - GT'	Vetor de clonagem contém o gene *gfp* sem promotor.Gm^R.	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000.
pPROBE-GT'-p*nodPQ*	Região promotora do gene *nodPQ* (1000 pb) clonada no sítio *Sac*I/*Bam*HI do vetor pPROBE-GT	ESTE TRABALHO
pPROBE-GT'-p*nopB*	Região intergênica entre os genes *nopB* e rhcC1 (880 pb), clonada no sítio *Sac*I/*Bam*HI do vetor pPROBE-GT'.	ESTE TRABALHO
pPROBE-GT-p*rhcC1*	Região intergênica entre os genes *nopB* e rhcC1 (880 pb), clonada no sítio *Sac*I/*Bam*HI do vetor pPROBE-GT.	ESTE TRABALHO
pPROBE-GT-p*y4xD*	Região promotora do gene *y4xD* (330 pb) clonada no sítio *Sac*I/*Bam*HI do vetor pPROBE-GT.	ESTE TRABALHO
pGT'-pnodD2II	Região intergênica entre os genes *ttsI* e *nodD2*, na direção de *nodD2* clonada no vetor pPROBE-GT', 2594pb. (*Bam*HI/*Eco*RI)	PINHEIRO, 2009
pTZ57R	Vetor de clonagem. Amp^R	FERMENTAS

FONTE: O autor.

3.2. Preparo de células competentes

Dois métodos de preparo de células competentesforam utilizados: células quimicamentecompetentes e eletrocompetentes. Em ambos os casos foi realizado um pré-inóculo de 5mL com as estirpes de *E. coli* DH10B, Top10 ou S17.1, aproximadamente 12 horas antes do procedimento. No dia seguinte, 500 µL desse pré-inóculo foram inoculados em 80 mL de meio de cultura LB (num erlenmeyer de

500 mL) e deixado incubando a uma temperatura de 37°C e agitação constante de 120 rpm até atingir $D.O._{.600}$ entre 0,2 e 0,4. Após atingir a D.O. desejada a cultura foi distribuída em 4 tubos de centrífuga estéreis e mantida em banho de gelo por 15 minutos antes do início do procedimento.

3.2.1 Preparo de células quimicamente competentes

As células foram 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 $MgCl_2$ 100mM. Uma nova centrifugação foi realizada, o *pellet* foi ressuspenso em 25 mL de solução de $CaCl_2$ 100mM e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida a cultura foi novamente centrifugada, as células foram ressuspensas em 800 µL de $CaCl_2$ 100mM preparada com 20% de glicerol e aliquotadas em porções de 100 µL em tubos de 1,5 mLestéreis e gelados. As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

3.2.2. Preparo de células eletrocompetentes

As células foram coletadas por centrifugação a 4500 rpm durante 5 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi lavado duas vezes com água Mili-Q estéril e gelada. A terceira lavagem foi realizada com glicerol 15% ao invés de água, e após a centrifugação aproximadamente 800 µL de sobrenadante foram deixados no frasco para ressuspender o *pellet*. As células foram divididas em alíquotas de 100 µL e armazenadas a -80°C.

3.3. Transformação de célula quimicamente competente

Uma alíquota de 100 µL de *E. coli* termo competente foi descongelada em banho de gelo, combinada a 1 µL da solução de 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 quinze minutos. Após isso, foi adicionado 600 µL de meio SOB 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 µL das células recuperadas

foram plaqueadas em meio LA com os antibióticos específicos.

3.4. Transformação por eletroporação

Uma alíquota de *E. coli* eletrocompetente foi descongelada em banho de gelo, combinada a 1 µL da solução de DNA e transferida para uma cubeta de eletroporação estéril (Bio-Rad) e então submetida a um campo elétrico de 1,8 V. Após a eletroporação as células foram recuperadas com 1000 µL de meio SOB e essa mistura de células com meio de cultura foi transferida para frasco apropriado e incubada sob agitação constante de 120 rpm por 40 minutos a 37°C. Para selecionar os transformantes, aproximadamente 100 µL das células recuperadas foram plaqueadas em meio LA com os antibióticos específicos.

3.5. Conjugação

Os plasmídeos mobilizáveis a serem transferidos para NGR234 foram primeiramente transformados em uma estirpe de *E. coli* capaz de formar *pili* conjugativo, a *E. coli*S17.1(SIMON*et al*., 1983). Tanto a estirpe doadora (*E.coli*S17.1 contendo o plasmídeo) quanto a receptora (NGR234 ou seus derivados) foram cultivados separadamente em meio de cultura sólido apropriado. Em seguida foi realizada a conjugação bi-parental dessas bactérias (DITTA *et al*., 1980), onde ambas foram plaqueadas ao mesmo tempo em uma mistura de meio de cultura sólido LA:TY e incubadas por 24 horas. No dia seguinte, a massa de células resultante foi coletada com alça esterilizada e transferida para meio TY sólido contendo os antibióticos seletivos.

4. SUPER-EXPRESSÃO PROTEICA

A estirpe de *E.coli*BL21 contendo o plasmídeo pET28-*syrM1* ou pET28-*syrM2* foi inoculada em 10 mL (quando em pequena escala) ou 300 mL (quando em larga escala) de meio LB acrescido de Km^{50} e incubadas a 37°C sob agitação constante de 120 rpm até atingir a $D.O._{600}$ de aproximadamente 0,5. Em seguida IPTG (concentração final de 250 µM)foi adicionado à cultura que foiincubada a

20°C*overnight*. Amostras antes e após a indução foram guardadas para confirmar a expressão das proteínas recombinantes através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970).

5. SOLUBILIZAÇÃO PROTEICA

5.1. Solubilização proteica em pequena escala

A expressão proteica em pequena escala foi induzida nos plasmídeos pET28-*syrM1* e pET28-*syrM2* para estabelecer as melhores condições de solubilidade das proteínas. Para tanto, após a indução as culturas (10 mL) foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm durante 7 minutos a temperatura ambiente, ressuspensas em 1 mL de tampão de sonicação gelado e mantidas no gelo deste ponto em diante. Vários tampões foram testados: tampão PII (50mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e 50% glicerol), tampão Glicina (20mM Imidazol, 50mM Tris, 0,1% Triton, 100mM de glicina e 50% de glicerol) e tampão $NaPO_4$ (100mM $NaPO_4$, 50 mM Ácido Aspártico, 100 mM NaCl e 50% de glicerol). Em seguida a solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 10 µL de PMSF 0,1M. A lise celular foi provocada por sonicação, sendo realizados 10 pulsos de 20 segundos cada com intervalos de um minuto entre eles. O lisado foi então centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado, o *pellet* ressuspenso em 1 mL de tampão e também armazenado. Ambas as frações foram posteriormente resolvidas em gel de acrilamida (SDS-PAGE).

5.2. Solubilização proteica em grande escala

Para extração de proteínas em grande escala, a cultura foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e o pellet ressuspenso em 30 mL de tampão de sonicação A (20mM imidazol, 50mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% Triton, 50mM glicina e 10% de glicerol). Em seguida 30 µL de PMSF 0,1 M e 30 µL de lisozima (20mg/mL) foram adicionados e as células incubadas em banho de gelo por 30 minutos. A lise foi realizada por sonicação em 30 pulsos de um minuto cada com intervalos de um minuto entre eles. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado para posterior purificação e o *pellet* ressuspenso em

30 mL de tampão A. Ambas as frações foram posteriormente resolvidas em gel de acrilamida (SDS-PAGE).

5.3. Sobilizaçãode proteínas a partir de corpos de inclusão

Para tentar recuperar maior quantidade das proteínas desejadas, estas foram purificadas a partir de corpos de inclusão, que são agregados proteicos observados em condições de super-expressão. Para tanto, após os 10 minutos de centrifugação a 6000 rpm, o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de uma solução de 50mM Tris e 100mM NaCl ao invés de tampão A. Em seguida 30 µL de PMSF 0,1 M foram adicionados e as células lisadas por sonicação em 30 pulsos de um minuto cada com intervalo de um minuto entre eles. O lisado foi centrifugado a 10000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi guardado. O *pellet* foi lavado duas vezes com 30 mL da mesma solução de Tris-NaCl citada anteriormente. Após as lavagem o *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de solução de sarcosina (40mM Tris, 50mM NaCl e 0,1% sarcosina) e deixado agitando a 120 rpm *overnight* a 20°C. Posteriormente essa solução foi centrifugada por 15 minutos a 4400 g e o sobrenadante foi separado para purificação. O *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de solução Tris-NaCl. Amostras de todas as etapas foram guardadas e posteriormente resolvidas em gel de acrilamida (SDS-PAGE).

6. PURIFICAÇÃO PROTEICA

6.1.Purificação em coluna de afinidade Hi-Trap Chelating (GE)

O sobrenadante livre de células foi aplicado em uma coluna Hi-Trap Chelating de 5 mL, carregada com níquel e acoplada ao sistema de purificação Akta (GE Healthcare). Após a passagem da amostra pela coluna as proteínas não adsorvidas à resina foram removidas através de lavagem com tampão A(20mM Imidazol, 50mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% Triton, 50mM glicina e 10% de glicerol). A eluição das proteínas de fusão foi feita através de lavagem da coluna com gradiente contínuo de imidazol utilizando tampão B (tampão A acrescido de 1 M imidazol). A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970) e as frações contendo as proteínas His-SyrM1 ou His-SyrM2 foram dialisadas contra tampão de

armazenamento (50mM Tris; 50mM NaCl; 50% glicerol) e armazenadas a -20°C.

6.2. Purificação em coluna de heparina

A fração previamente purificada por coluna de níquel foi diluída com água Mili-Q até reduzir a concentração de glicerol presente de 50% para 10%. À amostra foi adicionado10mM de $MgCl_2$ e esta foi então injetada na coluna de heparina (1 mL). As proteínas não adsorvidas à resina foram removidas através de lavagem com 5 volumes de tampão de heparina (10mM Tris-Cl pH 8,0; 0,1mM EDTA; 0,2mM $MgCl_2$ e 5% de glicerol) acrescido de 20mM NaCl. A eluição das proteínas foi feita através de lavagem da coluna com gradiente descontínuo de NaCl (tampão heparina contendo 0,1M; 0,2M; 0,3M; 0,4M; 0,5M; 0,7M; 1M e 2M de NaCl). A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE conforme Laemmli (1970) e as frações contendo as proteínas His-SyrM1 foram dialisadas contra tampão de armazenamento (50mM Tris; 50mM NaCl; 50% glicerol) e armazenadas a -20°C.

7. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970) foi realizada utilizando gel de poliacrilamida 12% e tampão de corrida Laemmli 1x, em sistema vertical Miniprotean (BioRad) com voltagem entre 60V e 150V durante uma ou duas horas. Antes de serem aplicadas no gel as amostras foram misturadas ao tampão de amostra e incubadas a 100°C de 3 a 5 minutos. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie R-250 (0,5% Coomassie; 50% Metanol; 7,5% ácido acético).

8. ENSAIO DE ALTERAÇÃO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

Fragmentos provenientes de restrições ou PCR marcados radioativamente,foram utilizados como molde. As reações de interação foram montadas através da mistura de diferentes concentrações da proteína purificadacom o DNA alvo, emtampão Binding (50mM Tris-Cl pH 8,0; 1,4mM EDTA; 10mM KCl; 0,5mM DTT; 5% glicerol; 50µg/mL BSA; 100mM NaCl). Logo após o preparo, as reações foram incubadas por 20 minutos em banho de gelo. Após esse tempo de incubação,uma solução composta por glicerol 50% e traços de azul de bromofenol

foi adicionada às reações. As amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida nativo 4%que havia sido previamente submetido a uma pré-corrida de 20 minutos a 50V,submerso em tampão nativo 1X (Tris 50 mM; 2M glicina; 10 mM EDTA; 8 mM $MgSO_4$). A eletroforese foi mantida a aproximadamente 24 mA por duas horas. Em seguida o gel foi aderido a uma folha de papel filtro, coberto com filme plástico e secado sob vácuo a 80°C. Depois de seco o gel foi exposto a uma tela de captura por no mínimo 4 horas e escaneadocom STORM Molecular Dynamics PhosphoImager (Amersham Biosciences).

9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

As regiões promotoras de interesse foram clonadas a montante do gene *gfp* presente no vetor pPROBE-GT e/ou pPROBE-GT'. Estes plasmídeos recombinantes foram inseridos nas estirpes mutantes e selvagem de NGR234 através de conjugação bi-parental. As colônias resultantes foram crescidas inicialmente em meio TY líquido contendo rifampicina e gentamicina e em seguida o crescimento foi sincronizado em meio RMS acrescido apenas de gentamicina. Posteriormente as culturas foram transferidas para bloco *deep well* onde foram cultivadas em RMS na presença ou ausência de 10^{-6} M de um mix de flavonóides (Apigenina, Crisina, Genisteína, Kampferol e Naringenina). Antes da transferência para o bloco as culturas foram diluídas a fim de iniciarem o experimento com a mesma $D.O._{595}$, igual a 0,1. O bloco foi então mantido a 28°C com agitação constante de 120 rpm e dele foram retiradas alíquotas para a leitura em espectrofluorímetro (TECAN i-control) dos níveis de expressão de GFP e da $D.O._{595}$no ponto zero, após 12, 36, 60, 84 e 108 horas. A fluorescência de GFP foi mensurada após excitação a 485 nm e capturada com filtro de 535 nm. Para manter a cultura em condições adequadas, em cada ponto de leitura quando se retirou uma alíquota da cultura para ser analisada, foi adicionado à cultura o mesmo volume de RMS complementado com o antibiótico apropriado, e com flavonóides para as culturas induzidas. Os níveis de expressão de GFP foram calculados através da razão entre a intensidade de fluorescência pela $D.O._{595}$ e é apresentada como unidades arbitrárias.

10. ANÁLISE DO FENÓTIPO DE NODULAÇÃO

Para avaliar o efeito de SyrM1 e SyrM2 sobre a nodulação de leguminosas, as espécies *Vigna unguiculata*(cultivar Red Caloona)*, Macroptilium atropurpureum, Tephrosia vogelii e Phaseolus vulgaris*(cultivar BAT93) foram inoculadas com a estirpe selvagem de NGR234 e com os mutantes NGR∆*syrM1*, NGR∆*syrM2* e NGR∆*syrM1*∆*syrM2*.

Inicialmente as sementes das plantas foram esterilizadas conforme descrito abaixo. *Vigna unguiculata:*ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos, $H_2O_2$5% por 5 minutos e etanol 70% por 5 minutos; *Macroptilium atropurpureum*:ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos,Tween 20 0,1% por 5 minutos e $H_2O_2$5% por 5 minutos; *Tephrosia vogelii*:ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos,Tween 20 0,1% por 10 minutos e $H_2O_2$5% por 5 minutos; e *Phaseolus vulgaris*: ácido sulfúrico puro por 10 minutos. Uma vez esterilizadas, as sementes foram lavadas com água estéril 10x e transferidas para placas de petri contendo B+D–ágar (0,5%), sob condições estéreis, onde permaneceram por três dias em estufa a 25º C e protegidas da luz. Após esse período de germinação, cada planta foicultivada em frasco *Magenta*® que forampreviamente preenchidos com vermiculita lavada e solução B+D de nutrientes e autoclavados a 120º C por 20 min. Os frascos foram tampados e transferidos para uma casa de vegetação onde foram cultivadas à temperatura de 28°C com 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Após dois dias os frascos foram destampados, as raízes das plantas foram inoculadas com as bactérias de interesse e a vermiculita foi coberta com bolinhas de polipropileno estéreis para evitar contaminação externa.Sempre que necessário, a solução B+D foi reposta no frasco.

Após um período de tempo suficiente para a formação de nódulos maduros e funcionais(Fix^+), que variou de 6 a 8 semanas de acordo com a leguminosa, as plantas foram colhidas para a análise do fenótipo de nodulação. O número e a massa de nódulos, bem como o massa fresca da parte aérea foram avaliados.

APÊNDICE 2 - CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES

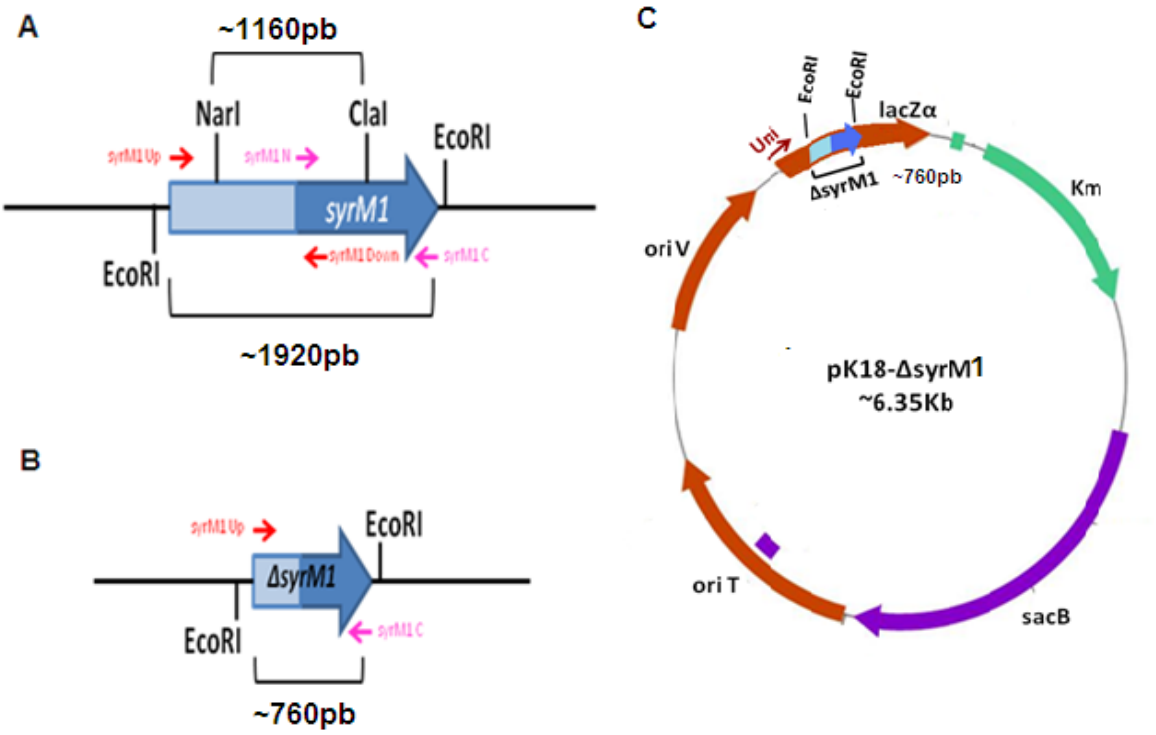
As estirpes mutantes NGR∆*syrM1,* NGR∆*syrM2* foram construídas através da deleção de um fragmento que inclui parte das regiões regulatórias e codificadoras de *syrM1* e *syrM2* respectivamente. A estirpe NGR∆*syrM1*/∆*syrM2,*mutante para ambos os genes também foi construída. O plasmídeo pK18*mobsac* foi utilizado como vetor suicida por apresentar gene *sacB* que confere sensibilidade à sacarose, característica importante para detecção de eventos de recombinação dupla(SCHÄFER *et al*., 1994).

2.1. Construção do mutante NGR∆*syrM1*

O plasmídeo pGEM-*syrM1*cvsup, construído por Pinheiro (2009), continha uma cópia intacta do gene *syrM1*amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores syrM1up e syrM1C e foi clivado com as enzimas de restrição *Nar*I e *Cla*I para deletar uma grande porção gênica, incluindo parte das regiões regulatória e codificante de *syrM1*(aproximadamente 1160 pb). Após a deleção ainda restou um fragmento de cerca de 760 pb, suficiente para que ocorresse o pareamento com a copia gênica normal durante o evento de recombinação. Desses 760 pb praticamente metade compreende o início da região regulatória enquanto o restante compreende o final da sequência codificante (Figura 2 A e B).

Após a restrição com *Nar*I e *Cla*I, as pontas da sequência foram ligadas novamente e o plasmídeo resultante foi transformado em *E. coli* DH10B. As colônias candidatas foram testadas por PCR com os *primers*syrM1C e syrM1up, resultando em um fragmento de aproximadamente 760 pb quando o inserto estava deletado ou em um fragmento de cerca de 1,9 kb quando o inserto estava inteiro. Após essa seleção o plasmídeo deletado, pGEM-∆*syrM1*cvsup, foi clivado com *Eco*RI e o inserto liberado foi purificado e clonado no vetor pK18*mobsacB* também cortado com *Eco*RI (Figura 2 C). Nessa etapa os clones foram novamente testados por PCR e também por restrição com *Eco*RI, além de serem sequenciados para confirmar a construção.

FIGURA 8 - ESQUEMA DA DELEÇÃO EM *syrM1* E CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pK18-Δ*syrM1.* A região regulatória do gene está representada em azul claro e a região codificante em azul escuro. A) pGem-*syrM1*cvsup antes da deleção, mostrando os sítios de restrição utilizados para provocar a mutação (*Nar*I e *Cla*I), os sítios para transferência do inserto para pK18*mobsacB* (*Eco*RI) e os oligonucleotídeos iniciadores específicos para essa sequência. B) pGem-*syrM1*cvsup após a deleção. C) pK18-Δ*syrM1.*



FONTE: O autor.

Logo que confirmado, o plasmídeo pK18-Δ*syrM1* foi transformado em *E.coli*S17.1 e transferido para a estirpe selvagem NGR234 por conjugação bi-parental. Em seguida as colônias recombinantes foram isoladas em meio seletivo contendo os antibióticos rifampicina e canamicina para selecionar colônias de *Rhizobium* contendo o vetor pK18*mobsacB.* Essas colônias foram então testadas por PCR com um oligonucleotídeo iniciador do inserto (syrM1C) e outro do plasmídeo (Universal) para a presença da região de interesse e com os *primers*TtsIdown e NB18for, que amplificam uma região de aproximadamente 500 pb específica de *Rhizobium.* Esse recombinante foi então crescido em meio de cultura sem canamicina para possibilitar o segundo evento de recombinação que gerou perda do plasmídeo com o gene *sacB* e o gene de resistência a canamicina, juntamente com a perda de uma das copias de syrM1, a intacta ou a mutada. Para selecionar essas colônias duplo recombinantes foi utilizado meio contendo sacarose

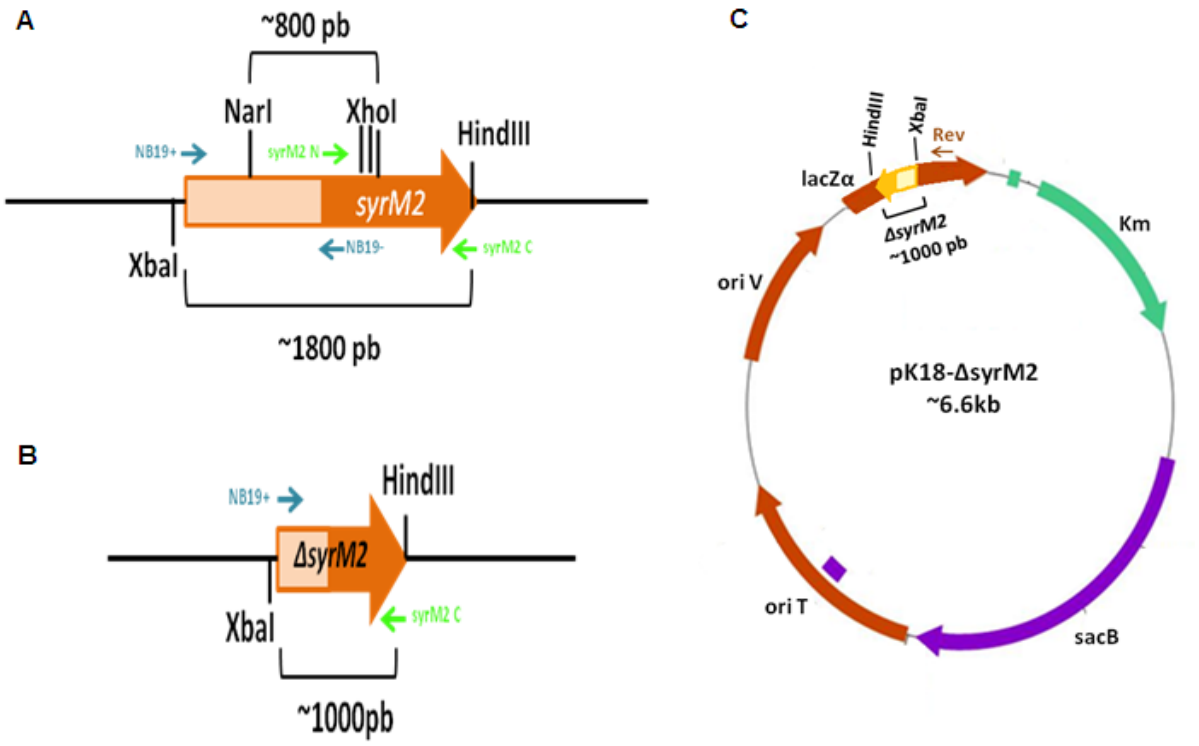
5%, onde apenas quem perdeu o gene *sacB* é capaz de crescer. As colônias resultantes foram testadas por PCR para encontrar o mutante desejado, ou seja, aquele que possui apenas a cópia mutada em seu genoma. A mutação ainda foi confirmada por hibridização.

2.2. Construção do mutante ∆*syrM2*

A produção do mutante NGR∆*syrM2* foi realizada de maneira muito semelhante ao mutante NGR∆*syrM1.* Um fragmento de aproximadamente 1800pb contendo toda região regulatória e codificante do gene *syrM2* foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores NB19+ e syrM2C, purificado, ligado no vetor pTZ57R e transformado em *E. coli* DH10B. As colônias resultantes foram testadas por restrição com *Eco*RI e em seguida clivadas com as enzimas de restrição *Nar*I e *Xho*I, para deleção de um fragmento de aproximadamente 800 pb, incluindo parte das regiões regulatória e codificante. O fragmento remanescente possui cerca de 1000 pb (Figura 3 A e B).As pontas do plasmídeo foram digeridas com a enzima *Klenow* e ligadas novamente. As colônias transformantes foram testadas para a presença do inserto por digestão com *Eco*RI e por PCR com os *primers* NB19+ e syrM2C. Após essa seleção, o plasmídeo foi clivado com *Hind*III e *Xba*I, o fragmento liberado foi purificado e clonado no vetor pK18*mobsacB* também cortado com as mesmas enzimas. Nessa etapa os clones foram testados por restrição com *Hind*III e *Xba*I e em seguida sequenciados para certificar a identidade da construção (Figura 3 C).

O plasmídeo pK18-∆*syrM2* foi então transformado em *E.coli*S17.1 e transferido para a estirpe selvagem de *Rhizobium* sp. NGR234 por conjugação bi-parental. Em seguida as colônias de NGR234 recombinantes foram isoladas em meio seletivo e testadas para a presença da região de interesse por PCR*.* Posteriormente esse recombinante foi crescido na ausência de canamicina e plaqueado em meio sólido contendo sacarose 5% para selecionar colônias duplo recombinantes. Essas colônias foram testadas por PCR para confirmar a ausência da cópia normal do gene. O mutante NGR∆*syrM2* resultante também foi confirmado por hibridização.

FIGURA 9 - ESQUEMA DA DELEÇÃO EM *syrM2* E CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pK18-Δ*syrM2.* A região regulatória do gene está representada em laranjado claro e a região codificante em laranjado escuro. A) Esquema do gene *syrM2* clonado no pTZ57-R/T antes da deleção, mostrando os sítios de restrição utilizados para provocar a mutação (*Nar*I e *Xho*I), os sítios para transferência do inserto para pK18*mobsac* (*Xba*I e *Hind*III) e os oligonucleotídeos iniciadores específicos para essa sequência. B) Esquema de *syrM2* após a deleção, ainda clonado no pTZ57-R/T. C) Mapa físico do plasmídeo pK18-Δ*syrM2.*



FONTE: O autor.

2.3. Construção do mutante duplo NGRΔ*syrM1*Δ*syrM2*

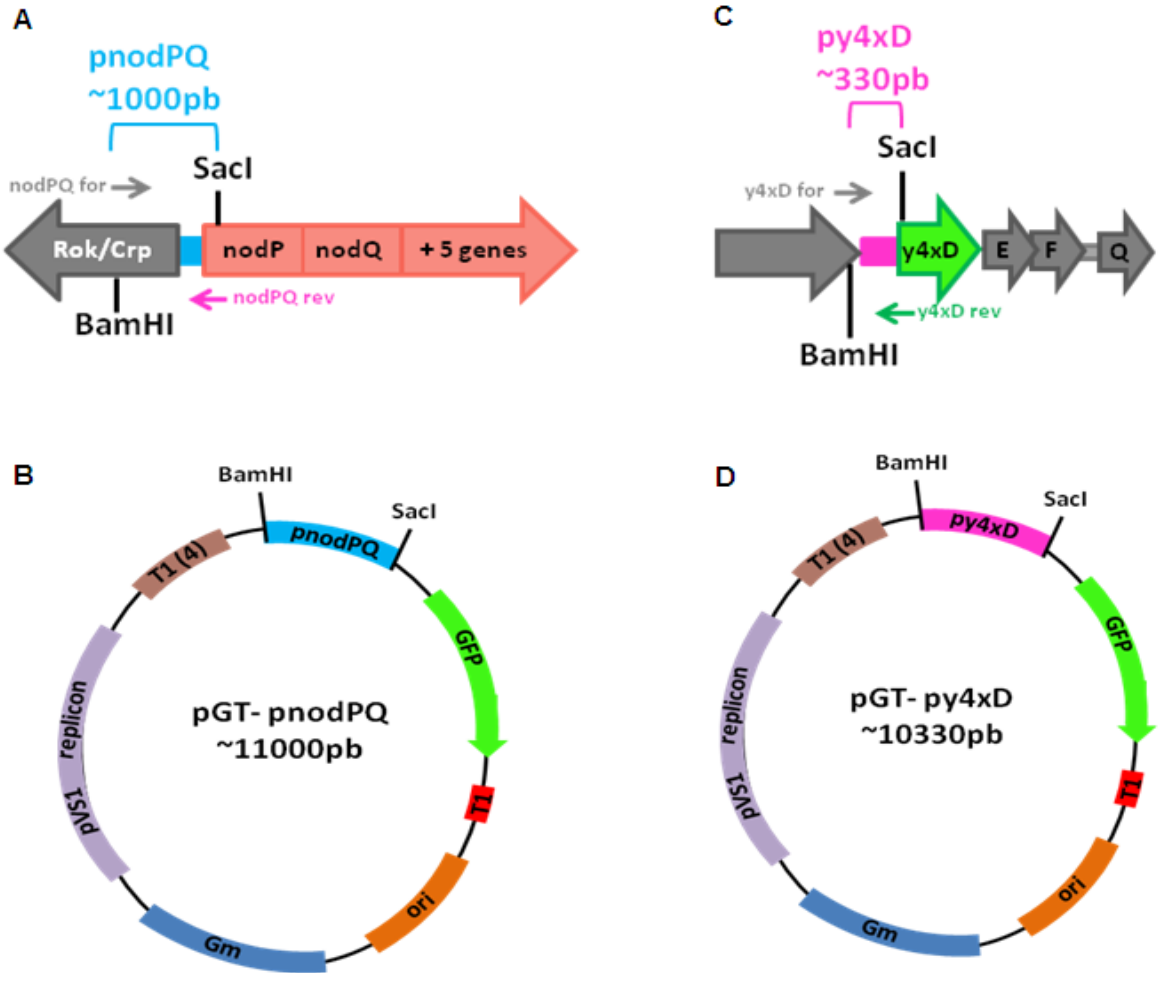
O plasmídeo pK18-Δ*syrM1*foi transformado em *E.coli* S17.1 e transferido para a estirpe mutante NGRΔ*syrM2* por conjugação bi-parental. As colônias recombinantes foram isoladas em meio seletivo e previamente testadas antes de serem cultivadas em cultura sem o antibiótico do vetor e selecionadas em meio contendo sacarose 5%. As colônias candidatas foram testadas por PCR e confirmadas por hibridização da mesma maneira como os mutantes simples descritos anteriormente.

APÊNDICE 3 -CONSTRUÇÃO DAS FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE *y4xD*, *nopB*, *rhcC1* e *nodPQ*COM*gfp*

Primeiramente foram planejados oligonucleotídeos iniciadores (quadro 1)com sítios de restrição *Bam*HI e *Sac*I para amplificar fragmentos contendo as regiões regulatórias dos genes de interesse. O par de oligonucleotideos nodPQfor/nodPQrev amplificou uma sequência de aproximadamente 1kb referente à região regulatória candidata dos genes *nodPQ*; y4xDfor/y4xDrev amplificaram cerca de 330pb referentes à região regulatória candidata de *y4xD*; e nopBrev/rhcC1rev foram usados para amplificar aproximadamente 880pb da região intergênica entre *nopB* e *rhcC1*.

Após serem amplificadas, as regiões regulatórias referentes a *y4xD* e *nodPQ*foram ligadas no vetor pTZ57R/T, que foi transformado em *E. coli* DH10B (figura 4A e 4B). As colônias foram testadas por PCR com *primers* específicos para cada região e em seguida os insertos foram sequenciados para confirmar sua identidade e a ausência de mutações. Após isso os plasmídeos foram clivados com *Bam*HI e *Sac*I e os insertos liberados foram clonados no vetor pPROBE-GT. Os clones foram testados por PCR novamente e por digestão com as enzimas *Eco*RI e *Xba*I. Um novo sequenciamento foi realizado. As fusões resultantes foram pPROBE-GT-*pnodPQ* e pPROBE-GT-*py4xD*(figura 4C e 4D).

FIGURA 10 - FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE *pnodPQ* e *py4xD* COM *gfp*. A) Esquema da localização genômica da região regulatória candidata do gene *nodPQ*. B) plasmídeo pPROBE-GT-*pnodPQ* com a região regulatória de *nodPQ* clonada a montante de *gfp*.C) Esquema da localização genômica da região regulatória candidata do gene *y4xD.* D) plasmídeo pPROBE-GT-*py4xD* com a região regulatória de *y4xD* clonada a montante de *gfp*.

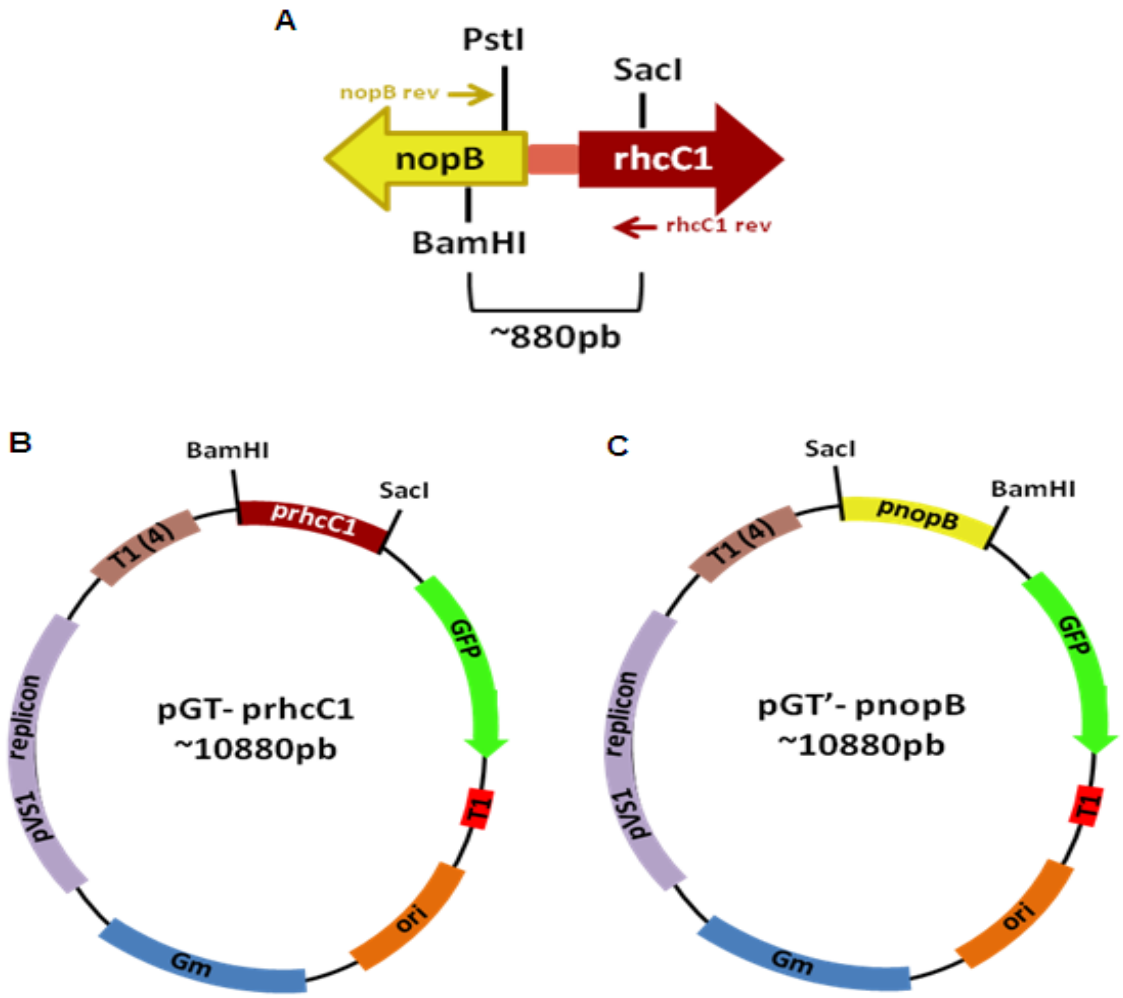


FONTE: O autor.

A região intergênica entre *nopB* e *rhcC1* foi amplificada com auxílio de uma Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion) e ligada ao plasmídeo pGEM-3Zf clivado com *Sma*I (figura 5A). Para testar os transformantes foi realizada uma PCR com os *primers* do inserto e o fragmento foi clivado com *Pst*I ou com *Eco*RI e *Hin*dIII. Depois dessa confirmação o inserto ainda foi sequenciado. Em seguida foi realizada a digestão dessa sequência com *Sac*I e *Bam*HI e a sua clonagem nos vetores pPROBE-GT e pPROBE-GT' para que ficasse nas duas orientações. Dessa forma os plasmídeos construídos foram pPROBE-GT-*prhcC1* e pPROBE-GT'-*pnopB*que

contém a região intergênica de *nopB* e *rhcC1* fusionada com a sequencia codificante de *gfp* na direção de rhcC1 e nopB respectivamente (figura 5B e 5C). Para testar as colônias nessa etapa foi realizada uma PCR com os *primers* do inserto e a sua restrição com *Sac*I e *Bam*HI. Também foi realizada uma PCR com um dos *primers* do inserto (nopBrev ou rhcC1rev) e outro do vetor (GFP5') para confirmar a orientação da sequência no plasmídeo.

FIGURA 11 - FUSÕES TRANSCRICIONAIS DE *pnopB* e *prhcC1* COM *gfp*. A) Esquema da localização genômica da região regulatória candidata dos genes *nopB* e *rhcC1*. B) plasmídeo pPROBE-GT-*prhcC1* com a região regulatória de rhcC1 clonada a montante de *gfp*. D) plasmídeo pPROBE-GT'-*pnopB* com a região regulatória de nopB clonada a montante de *gfp.*



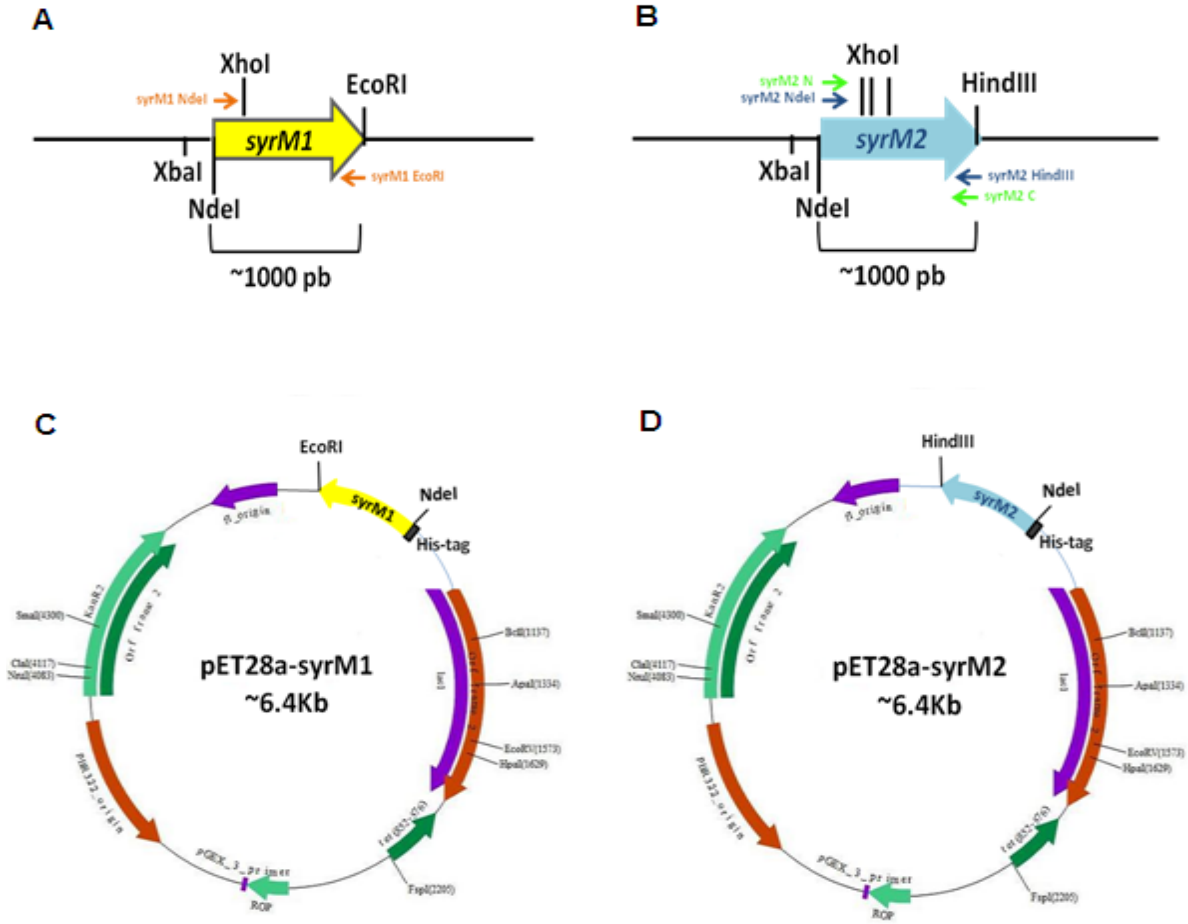
FONTE: O autor.

APÊNDICE 4 - CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET28-*syrM1* E pET28-*syrM2*

A região codificadora dos genes *syrM1* e *syrM2* foi amplificada com o auxílio de oligonucleotídeos iniciadores criados para inserir sítios de restrição à sequência de tal forma que sua posterior clonagem no vetor pET28a, a jusante da cauda de histidinas, fosse possível. Os sítios inseridos foram para *Nde*I e *Eco*RI em *syrM1* e para *Nde*I e *Hin*dIII em *syrM2*. Os fragmentos de DNA amplificados (aproximadamente 1kb cada) foram primeiramente ligados ao plasmídeo pTZ57R/T e os transformantes foram testados para a presença do inserto através de restrição com a enzima *Xho*I. As colônias candidatas de *syrM2* também foram testadas por PCR com os *primers* syrM2C e syrM2N (Figura 12 A e B). Em seguida ambos os clones foram sequenciados para garantir a ausência de mutações e a integridade dos insertos.

Posteriormente os plasmídeos pTZ57-*syrM1* e pTZ57-*syrM2* foram clivados com *Nde*I/*Eco*RI e *Nde*I/*Hin*dIII, respectivamente, e os insertos foram clonados no vetor pET28a clivado com as mesmas enzimas. Após a transformação, as colônias candidatas foram testadas por digestão com *Eco*RI/*Xba*I e por PCR com os *primers* syrM1-*Nde*I/syrM1-*Eco*RI no caso do plasmídeos pET28a-*syrM1*, ou por digestão com *Hin*dIII/*Xba*I e PCR com os *primers* syrM2-*Nde*I/syrM2-*Hin*dIII no caso do plasmídeo pET28a-*syrM2*(Figura 12 C e D).

FIGURA 12 - CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pET28-*syrM1* e pET28-*syrM2*. Os esquemas A e B mostram os genes *syrM1* e *syrM2* respectivamente, ambos clonados no pTZ57, com os sítios de restrição e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na construção. C) Mapa físico do plasmídeo pET28-*syrM1*. D) Mapa físico do plasmídeo pET28-*syrM2*.



FONTE: O autor.

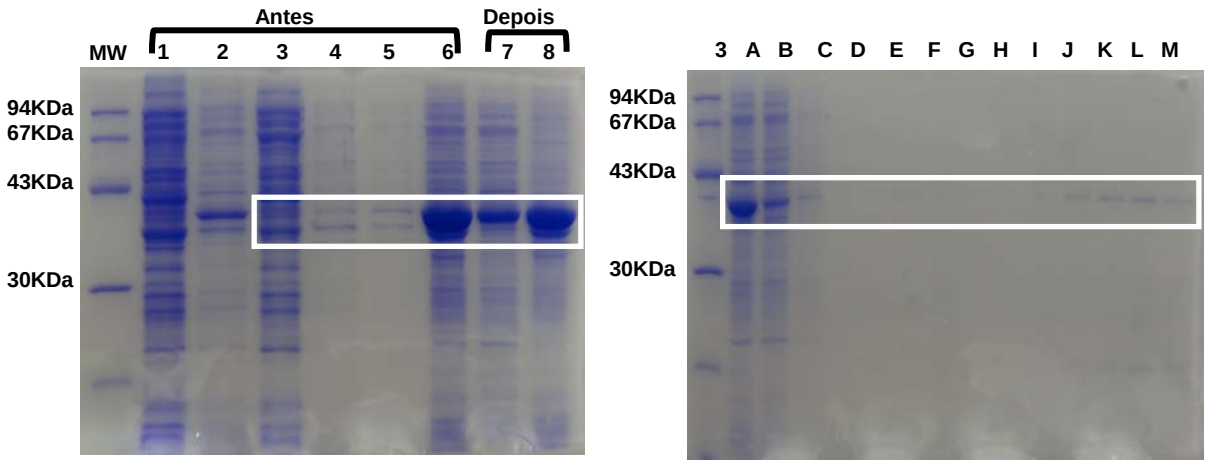
APÊNDICE 5 - EXPRESSÃO, SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃOSyrM1-His E SyrM2-His

Os plasmídeos construídos pET28a-*syrM1* epET28a-*syrM2* foram transformados em *E. coli* BL21, estirpe capaz de reconhecer o promotor do fago T7, e a cultura foi mantida a 20°C *overnight* sob indução de 250 µM de IPTG para expressar as proteínas de interesse. Em seguida as proteínas foram solubilizadas em tampão A(20mM Imidazol, 50mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% Triton, 50mM glicina e 10% de glicerol) e purificadas em coluna HiTrap Chelating no sistema de cromatografia AKTA (GE Healthcare). No entanto, como as proteínas SyrM1 e SyrM2 são muito insolúveis, grande quantidade ficou no pellet da amostra e foi perdida. Além disso, como a concentração de SyrM1-His e SyrM2-His na fração solúvel era muito baixa não foi possível coletá-las após a purificação.

Para tentar aumentar a solubilidade proteica inicialmente a fração insolúvel de SyrM2-His foi tratada com sarcosina 0,10%. Com isso foi possível aumentar a quantidade de proteína na fração solúvel da amostra (Figura 13) e realizar a purificação.

Como resultado da purificação foi observado que uma quantidade relativamente grande de SyrM2-His não ficou retida na coluna e o restante da proteína foi eluída com diferentes concentrações de imidazol (Figura 13). As frações foram reunidas e a concentração final de SyrM2 foi de 2µM (Figura 16). No entanto, apesar de estar diluída, a amostra de SyrM2-His purificada pôde ser utilizada nos Ensaios de Mobilidade Eletroforética

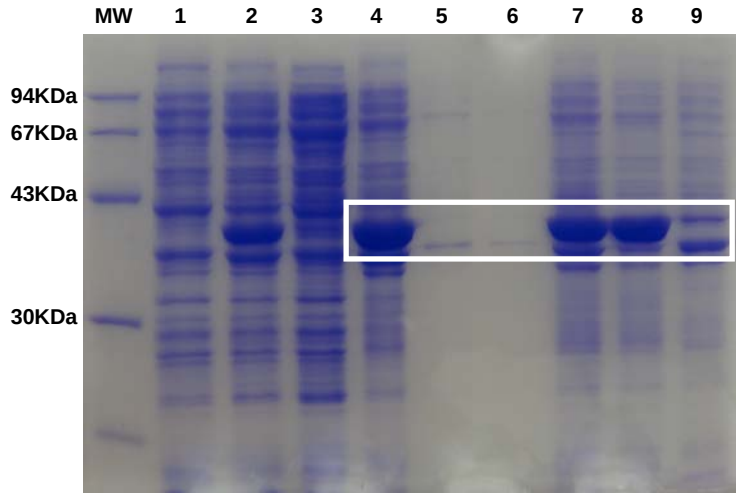
FIGURA 13 - SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SyrM2-HIS. Eletroforese SDS PAGE 12% poliacrilamida. O quadro branco indica a localização das proteínas no gel. Linha 3: fração solúvel antes do tratamento com sarcosina; Linha 6: fração insolúvel antes do tratamento com sarcosina. Linha 7: fração solúvel após a adição de sarcosina; Linha 8: fração insolúvel após o tratamento com sarcosina. Linha A: fração coletada durante a injeção da amostra na coluna de purificação. Linha B: fração coletada durante a lavagem da amostra na coluna de purificação. Linhas de C a M: frações coletadas durante o gradiente de imidazol na purificação. As frações referentes as linhas J, K, L, M e mais quatro frações não mostradas no gel foram reunidas, dialisadas e armazenadas para serem utilizadas no EMSA.



FONTE: O autor.

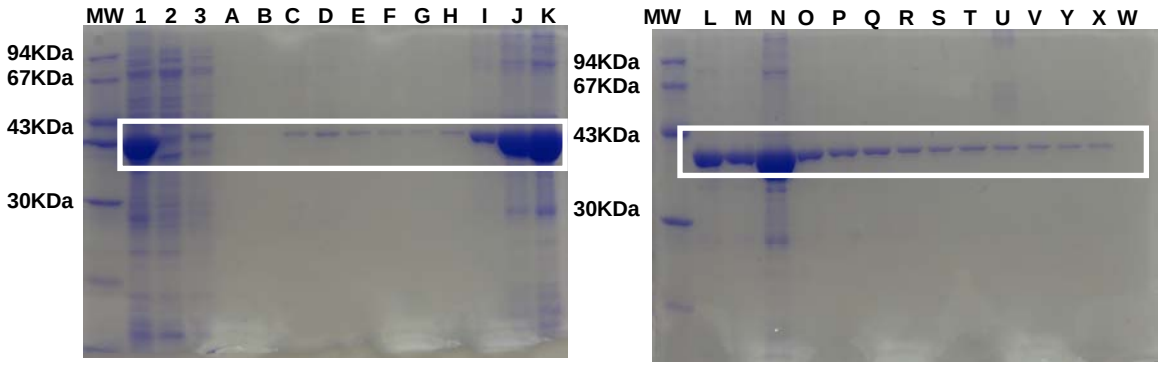
O mesmo procedimento utilizado para solubilizar SyrM2-His foi realizado com SyrM1-His, porém a concentração de sarcosina foi maior, 0,15%. O resultado obtido foi uma concentração de proteínas alvo realmente mais elevada na fração solúvel do que aquela observada em SyrM2, de tal modo que para SyrM1 foi obtida uma quantidade muito maior da proteína no sobrenadante do que no *pellet* (Figura 14). Na purificação o resultado encontrado também foi melhor. A proteína ainda ficou espalhada em várias frações, mas com uma alta concentração em determinados pontos que puderam ser reunidos em dois grupos distintos: um grupo onde SyrM1 estava menos concentrada e outro grupo onde ela estava mais concentrada, porém menos pura (Figuras 15 e 16). A fração mais concentrada passou por um segundo processo de purificação em coluna de heparina na tentativa de separar SyrM1-His das demais proteínas contaminantes. No entanto, a proteína de interesse não pôde ser recuperada após a passagem pela coluna de heparina e dessa forma apenas a fração menos concentrada de SyrM1-His 5,15 µM foi utilizada no EMSA.

FIGURA 14 - SOLUBILIZAÇÃO DE SyrM1-His A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO. Eletroforese SDS PAGE 12% de poliacrilamida.O quadro branco indica a localização das proteínas no gel. Linha 4: fração solúvel antes do tratamento com sarcosina; Linha 7: fração insolúvel antes do tratamento com sarcosina. Linha 8: fração solúvel após o tratamento com sarcosina; Linha 9: fração insolúvel após o tratamento com sarcosina.



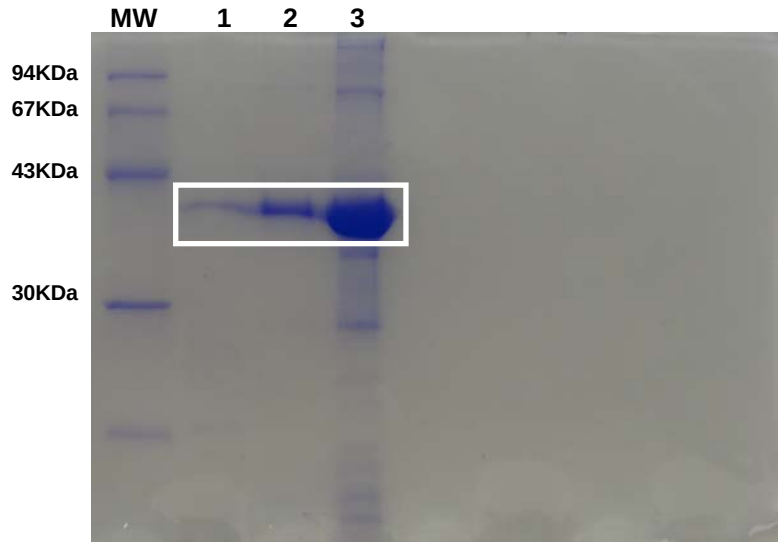
FONTE: O autor.

FIGURA 15 - PURIFICAÇÃO DE SyrM1-His. Eletroforese SDS PAGE 12%. O quadro branco indica a localização das proteínas no gel. Linha 1: amostra solúvel antes da purificação. Linha 2: fração coletada durante a injeção da amostra na coluna de purificação. Linha 3: fração coletada durante a lavagem da amostra na coluna de purificação. Linhas de A a W: frações coletadas durante o gradiente de Imidazol na purificação. As frações referentes as linhas J, K, L, M e N foram reunidas, dialisadas e armazenadas, constituindo uma amostra mais concentrada e menos pura, enquanto as linhas I, O, P, Q, R e S foram reunidas, dialisadas e armazenadas, constituindo uma amostra menos concentrada, porém mais pura.



FONTE: O autor.

FIGURA 16 - PROTEÍNAS PURIFICADAS POR COLUNA HI-TRAP CHELATING HP. Eletroforese SDS PAGE 12%. Linha 1: SyrM2-His; Linha 2: SyrM1-His menos concentrada e mais pura; SyrM1-His mais concentrada e menos pura.



FONTE: O autor.

Uma segunda purificação de SyrM2 foi realizada após o tratamento da amostra com 0,15% de sarcosina na tentativa de obter uma fração mais concentrada dessa proteína, no entanto, os resultados observados tanto na solubilização quanto na purificação foram muito semelhantes aqueles obtidos anteriormente, quando apenas 0,10% de sarcosina foi utilizada. A concentração de SyrM2 após essa purificação foi de 1,14 µM. Ambas as frações foram utilizadas no EMSA.

ANEXOS

ANEXO 1 -MEIOS DE CULTIVO

Meio LB (Luria Bertani Broth):

Componente	Gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH do meio de cultura é ajustado para 7,0 com NaOH 1M. A esterilização é realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio LA será acrescido 1,5% de agar ao meio LB.

Meio TY (*triptone-yeast*):

Componente	Gramas/litro
Extrato de levedura	3,0
$CaCl_2.H_2O$	0,87
Triptona	5,0

O pH do meio de cultura é corrigido para 6,8 com NaOH 1 M. A esterilização é realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio TY sólido é acrescido 1,5% de ágar.

RMS

O meio RMS é preparado a partir de soluções estoque individuais.
Soluções estoque:
Solução I-A: 205 g/L K_2HPO_4; 145 g/L KH_2PO_4; 15 g/L NaCl
Solução I-B: 50 g/L NH_4NO_3
Solução II: 50 g/L $MgSO_4$-$7H_2O$
Solução III: 2,5 g/L $CaCl_2$-$2H_2O$

Solução IV (para 100mL): 123 g/L $MgSO_4$-$7H_2O$; 87 g/L K_2SO_4; 0,34 g/L $MnSO_4.H_2O$; 0,25 g/L H_3BO_3; 0,29 g/L $ZnSO_4.7H_2O$; 0,1 g/L $CuSO_4.5H_2O$; 0,06g/L $CoSO_4.7H_2O$; 0,05 g/L $Na_2MoO_4.2H_2O$

Solução de vitaminas de Gamborg 1000X (Sigma)

Succinato de sódio: 324 g/L

As soluções I-A, I-B, II, III e IV são autoclavadas, enquanto a solução de succinato de sódio é filtrada.

Preparação do RMS:

Para o preparo de 1 litro de meio RMS são adicionados 10 mL das soluções I-A, I-B e II e 1 mL das soluções III, IV e de vitaminas. Como fonte de carbono são adicionados 10 mL de solução de succinato de sódio.

Solução B+D

A solução B+D é preparada a partir dais seguintessoluções estoque individuais:

Solução A: $CaCl_2$ 2 mol/L

Solução B1: KH_2PO_4 1 mol/L

Solução B2: KH_2PO_4 1 mol/L

Solução C: $FeC_6H_6O_7$. $2H_2O$ 0,02 mol/L

Solução D: $MgSO_4$ 0,5 mol/L; K_2SO_4 0,5 mol/L; $MnSO_4$ 2mmol/L; H_3BO_3 4 mmol/L; $ZnSO_4$ 1mmol/L; $CuSO_4$ 4 mmol/L; $CoSO_4$ 0,2 m mol/L; Na_2MoO_4 0,2 mmol/L.

Todas as soluções devem ser autoclavadas.

Preparação de B+D:

Para o preparo de 1 litro de meio B+D são adicionados 500µL de cada solução, em condições estéreis.