

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

POLIANA GRAZIELA SCHREINER

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Phaseolus vulgaris* DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO COM AS ESTIRPES MUTANTES  
*rhcN* e *nopJ* DE *Rhizobium sp.* NGR234

CURITIBA

2009

POLIANA GRAZIELA SCHREINER

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Phaseolus vulgaris* DIFERENCIALMENTE  
EXPRESSOS DURANTE A INTERAÇÃO COM AS ESTIRPES MUTANTES  
*rhcN* e *nopJ* DE *Rhizobium* sp. NGR234

Monografia apresentada à disciplina  
Estágio em Genética como requisito  
Parcial à conclusão do Curso de  
Ciências Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli Wassem

Curitiba  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Roseli Wassem, pela paciência e dedicação.

Aos demais professores, pelo conhecimento transmitido.

Aos colegas do laboratório, em especial a Paloma Bonato, pela paciência e apoio.

Ao meu pai, mãe e irmãos, pela dedicação, pelos bons exemplos e por todo amor.

Ao Luciano, por todo amor e compreensão.

Aos colegas de faculdade, pelas trocas, risadas e pelos cadernos.

As amigas da minha cidade, que mesmo distantes, sempre estiveram muito presentes e interessadas nas minhas atividades.

Por fim, mas não menos importante, a Renata, ao meu lado desde o começo, nos momentos alegres e difíceis também.

## RESUMO

*Rhizobium* sp. NGR234 é um microorganismo fixador de nitrogênio, capaz de responder a estímulos químicos fornecidos por plantas leguminosas. Tal resposta faz com que se estabeleçam relações simbióticas entre a planta e a bactéria, culminando na formação de nódulos radiculares fixadores de nitrogênio. O Sistema de Secreção Tipo III é um dos fatores essenciais para a formação dos nódulos simbióticos em linhagens de rizóbios. Nestes, o TTSS transporta uma ampla variedade de proteínas (Nop e Rhc), tanto para o meio extracelular, quanto para o citoplasma das células eucarióticas, influenciando o processo de infecção para a nodulação. NGR234 secreta pelo menos oito proteínas de maneira dependente de TTSS. Quando abolida a secreção destas proteínas, a formação dos nódulos pode ser afetada de diferentes maneiras: inibir a formação, reduzir ou aumentá-la. O gene *rhcN* codifica uma proteína com características de ATPase, responsável por fornecer energia ao aparato de secreção. Plantas de espécies diferentes manifestam fenótipos diferentes quando inoculadas com este mutante. Outro exemplo é que mutações sítio dirigidas nas seqüências conservadas de aminoácidos no gene *nopJ* produz uma estirpe que induz maior nodulação na planta em relação ao selvagem. Após o cultivo de *Phaseolus vulgaris* e posterior inoculação com a estirpe selvagem e os mutantes *rhcN* e *nopJ* de *Rhizobium* sp. NGR234 observou-se maior eficiência na capacidade de nodulação pelas estirpes *rhcN* e *nopJ*. Posteriormente foi extraído o RNA total dos nódulos simbióticos e produziu-se cDNA, com o qual foram realizadas reações de PCR, para identificar a existência de genes diferencialmente expressos entre as três linhagens. Após o estabelecimento das condições ideais de PCR para a investigação foi possível observar um padrão de bandas diferenciais entre as três estirpes, concluindo-se que a estratégia utilizada é eficiente para o objetivo. Os fragmentos amplificados diferencialmente serão clonados e seqüenciados para posterior investigação de suas funções.

Palavras-chave: NGR234. *Phaseolus vulgaris*. Sistema de Secreção Tipo III.

## ABSTRACT

*Rhizobium* sp. NGR234 is a symbiotic microorganism that is able to fix nitrogen when interacting with leguminous plants. Signal exchange between partners promotes the formation of nitrogen fixing symbiotic root nodules. The Type III Secretion System (TTSS) is one of the main factors affecting symbiotic nodule formation in *Rhizobium* strains. TTSS transports a wide variety of proteins (Nop and Rhc) to the extracellular medium and directly into the eukaryotic cells cytoplasm, influencing the infection process for nodulation. NGR234 secretes at least eight proteins through the TTSS. When the secretion of these proteins is abolished, nodule formation can be affected in different ways: inhibiting, reducing or increasing the formation. The *rhcN* gene codes for a protein with ATPase characteristics, responsible for the input of energy to the secretion machine. Plants from different species manifest different phenotypes when inoculated with this mutant. Another example is that site directed mutagenesis in conserved regions of the *nopJ* gene produces a strain that induces nodulation more efficiently than the wild type. After inoculation of *Phaseolus vulgaris* with the wild type, *rhcN* and *nopJ* strains of *Rhizobium* sp. NGR234, total RNA was extracted from symbiotic nodules and converted into cDNA. PCR reactions using cDNA and random primers were performed to investigate the presence of differentially expressed genes between the three strains. Potential regions were observed after PCR and will be cloned for sequencing and identification.

Keywords: NGR234. *Phaseolus vulgaris*. Type III Secretion System.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	9
2.1 GERAL .....	9
2.2 ESPECÍFICOS .....	9
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
3.1 <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 .....	11
3.2 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III .....	12
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 ESTRATÉGIA GERAL.....	16
4.2 RIZÓBIOS E PLANTAS UTILIZADAS .....	16
4.3 MEIOS DE CULTURA .....	16
4.4 CULTURA E CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES NGR234, <i>nopJ</i> E <i>rhcN</i> DE RIZÓBIOS .....	18
4.5 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO DAS PLANTAS .....	18
4.6 PREPARAÇÃO DOS POTES DE CULTIVO .....	18
4.7 ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	19
4.8 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES .....	19
4.9 TRANSFERÊNCIA DAS SEMENTES PARA OS POTES DE CULTIVO ....	20
4.10 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS .....	20
4.11 EXTRAÇÃO DE RNA .....	21
4.12 INSTRUÇÕES DE PREPARO .....	22
4.13 PREPARO DOS PRIMERS .....	22
4.14 SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA ATRAVÉS DE TRANSCRIÇÃO REVERSA .....	23
4.15 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>P. vulgaris</i> .....	24
4.16 REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA .....	24
4.17 ELETROFORESE .....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	27
5.1 ENSAIOS DE NODULAÇÃO .....	28
5.2 EXTRAÇÃO DE RNA DOS NÓDULOS.....	29

5.3 OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR A PARTIR DO RNA EXTRAÍDO .....	31
5.4 PROSPECÇÃO DE REGIÕES DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS .....	32
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é uma molécula de importância fundamental para o metabolismo e síntese de proteínas. Devido a isto, a fixação biológica de nitrogênio, conversão de nitrogênio atmosférico a amônia por bactérias, é essencial para a agricultura, especialmente em solos pobres desse elemento. Em função disso, existe muito interesse em se entender os mecanismos envolvidos nesta simbiose.

Os rizóbios são microorganismos capazes de desenvolver relações simbióticas com plantas da família Fabaceae (leguminosas) onde são capazes de fixar nitrogênio. O estabelecimento da simbiose é bastante específico entre as linhagens de microorganismo e as espécies vegetais e varia desde rizóbios com uma pequena faixa de legumes hospedeiros ou rizóbios com uma ampla faixa (DENARIÉ; DEBELLÉ; ROSEMBERG, 1992), como é o caso de *Rhizobium* sp. NGR234 (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

Nestas relações simbióticas há a formação de nódulos radiculares que são então colonizados pelos microorganismos diazotróficos (fixadores de nitrogênio) e como resultado, o microssimbionte é capaz de fixar nitrogênio atmosférico e fornecê-lo ao macrossimbionte (PÜHLER *et al.*, 2004).

Estudos revelaram que durante a infecção e nodulação ambos os participantes trocam moléculas sinalizadoras. Flavonóides secretados pelas raízes dos legumes interagem com proteínas NodD do rizóbio e ativam a transcrição de genes *nod* (genes de nodulação). Estes genes induzem a síntese de lipo-quitooligosacarídeos na bactéria, os Fatores Nod. Com a síntese dos Fatores Nod, uma via específica de transdução de sinais é desencadeada na planta e induz a expressão de genes específicos para o desenvolvimento nodular (DENARIÉ; DEBELLÉ; ROSEMBERG, 1992; HANIN *et al.*, 1998).

Além disso, existe em NGR234 um sistema de secreção do tipo III (TTSS), um complexo de multi-proteínas conservado entre bactérias patogênicas, onde foram primeiramente descritos. Em rizóbios, o TTSS transporta uma ampla variedade de proteínas (Nop e Rhc), tanto para o meio extracelular quanto para o citoplasma das células eucarióticas e influencia no processo de infecção para a nodulação (MARIE *et al.*, 2003; MARIE *et al.*, 2004; AUSSMESS *et al.*, 2004).

Em NGR234, este sistema é regulado por um ativador transcricional chamado TtsI, cuja expressão é regulada por um *nod-box*. O gene *ttsI* é dependente de NodD1 e de flavonóide e é expresso tardiamente durante o processo de nodulação (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Seqüências conservadas, chamada *tts-box*, são encontradas nas regiões promotoras dos genes *rhc* e *nop*, e estas são ativadas por TtsI. Onze *tts-box* foram identificadas no plasmídeo pNGR234a e estão relacionadas com a formação do aparato de secreção e de genes codificadores de Nops e lipopolissacarídeos ricos em ramnose (MARIE *et al.*, 2004).

A capacidade de nodulação pode ser afetada quando mutações são introduzidas nos genes ativadores de TTSS (PÜHLER *et al.*, 2004). O produto de *rhcN* apresenta características de uma ATPase (VIPREY *et al.*, 1998) e o mutante *rhcN* é afetado na secreção de proteínas (MARIE *et al.*, 2004). Plantas de espécies diferentes manifestam fenótipos diferentes quando são inoculadas com este mutante.

NopJ, uma proteína efetora, homóloga de YopJ de *Yersinia* sp., e de produtos de genes *avr*, (proteínas que determinam maior virulência de bactérias fitopatogênicas) tem atividade de protease. Mutações nas seqüências conservadas de aminoácidos no gene *nopJ* produz uma estirpe com maior eficiência de nodulação na planta em relação ao selvagem. Dependendo da planta estudada, as proteínas secretadas podem ter efeitos variáveis e isso pode ser explicado pelo fato de diferentes flavonóides (moduladores dos níveis de expressão das proteínas secretadas) serem produzidos por cada planta. Além disso, as proteínas secretadas podem ser reconhecidas pelas plantas em diferentes graus e algumas espécies podem não possuir receptores corretos para os Nops, reconhecendo-os como fatores de virulência, ocasionando uma resposta de defesa e não um processo simbiótico (MARIE; BROUGHTON; DEAKIN, 2001).

Para contribuir com a compreensão dos mecanismos de reconhecimento entre planta e bactéria, este trabalho visa a prospecção de genes candidatos que influenciem neste processo. Para tanto, RNA total foi extraído de nódulos induzidos por estirpes de baixa eficiência de nodulação (NGR234) e de alta eficiência (*nopJ* e *rhcN*). Após conversão a cDNA, reações de PCR foram realizadas para a obtenção de bandas diferencialmente amplificadas, de *Phaseolus vulgaris*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Este trabalho visa identificar genes de *P. vulgaris* que respondem aos sinais moleculares secretados pelo sistema de secreção do tipo III de *Rhizobium* sp. NGR234.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Cultivar, em condições estéreis, *P. vulgaris* e inocular com as estirpes selvagem, *rhcN* e *nopJ* para obtenção dos nódulos.

Extrair RNA total dos nódulos obtidos e produzir cDNA a partir deste.

Amplificar o cDNA, comparar o perfil eletroforético dos produtos amplificados e isolar fragmentos com amplificação diferencial.

Extrair o DNA das bandas diferencialmente amplificadas para posterior clonagem e sequenciamento.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O nitrogênio é uma molécula de importância fundamental para o metabolismo de todos os seres vivos, pois é componente de diversas biomoléculas. As plantas, produtores primários na cadeia alimentar, precisam absorver nitrogênio através de suas raízes, mas este é pouco abundante nos solos. Esta baixa disponibilidade de nitrogênio para as plantas tem sido o fator limitante na produtividade agrícola, que é minimizado com o uso de fertilizantes nitrogenados. Tanto a produção quanto a utilização de fertilizantes nitrogenados químicos são altamente dispendiosos, além de poluentes (JU *et al.*, 2009). A fixação biológica de nitrogênio, conversão de nitrogênio atmosférico a amônia por bactérias, é uma importante alternativa, altamente benéfica para a agricultura, especialmente em solos pobres desse elemento. Portanto, devido a tal importância existe muito interesse em se entender os mecanismos envolvidos neste processo.

*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente rizóbios) são gêneros de microorganismos capazes de fixar nitrogênio através do estabelecimento de relações simbióticas com plantas da família Fabaceae (leguminosas). A interação entre as linhagens de microorganismos e as espécies vegetais é bastante específica, mas varia desde rizóbios com uma pequena faixa de legumes hospedeiros até rizóbios com uma ampla faixa (DENARIE; DEBELLÉ; ROSEMBERG, 1992). *Rhizobium* sp. NGR234 é a estirpe de mais ampla faixa de hospedeiros entre os rizóbios, podendo nodular mais de 112 gêneros de legumes (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

O estabelecimento da simbiose entre rizóbios e seus hospedeiros culmina com a formação de nódulos radiculares, que são colonizados pelos microorganismos diazotróficos (fixadores de nitrogênio) e como resultado, o microsimbionte é capaz de fixar nitrogênio atmosférico e fornecê-lo ao macrossimbionte (PÜHLER, *et al.*, 2004). A formação dos nódulos envolve a troca de sinais moleculares entre a planta e a bactéria. Flavonóides produzidos pelas plantas induzem a expressão de proteínas bacterianas, responsáveis pela síntese de moléculas sinalizadoras, chamadas fatores Nod. Com a síntese

dos Fatores Nod, uma via específica de transdução de sinais é desencadeada na planta, induzindo a expressão de genes específicos para o desenvolvimento nodular (DENARI;, DEBELL; ROSEMBERG, 1992; HANIN *et al.*, 1998; BROUGHTON *et al.*, 2000; COOPER, 2007). A interação provoca modificações fisiológicas na planta, permitindo sua infecção pelo rizóbio. Os primeiros eventos simbióticos são a deformação dos pelos radiculares (enrolamento) e mitose das células corticais, formando o nódulo primordial. Uma estrutura vegetal tubular denominada cordão de infecção é formada para que as bactérias penetrem nas regiões mais internas do tecido radicular. As bactérias se proliferam até que o cordão atinja o córtex radicular, onde são liberadas. No córtex, cada rizóbio é endocitado por uma célula cortical, onde irá se diferenciar em bacteróide, que é a forma capaz de fixar nitrogênio atmosférico (BROUGHTON *et al.*, 2000; PERRET *et al.*, 2000 ; JONES *et al.*, 2007; COOPER, 2007).

### 3.1 *Rhizobium* sp. NGR234

O bacilo gram-negativo *Rhizobium* sp. NGR234 (New Guinea *Rhizobium* 234), ordem Rhizobiales, possui um amplo número de hospedeiros, sendo capaz de nodular até mesmo *Parasponia andersonii*, uma não leguminosa (PUEPPKE; BROUGHTON 1999).

NGR234 possui um genoma de 6,9 Mpb, dividido em três replicons: um plasmídeo simbiótico (pNGR234a) de 0,54Mpb, um megaplasmídeo (pNGR234b) de 2,43Mbp e um cromossomo de 3,93Mbp (cNGR234), que codifica a maioria das proteínas com funções essenciais para o crescimento celular. O plasmídeo simbiótico pNGR234a deste microssimbionte contém os genes essenciais para a nodulação, dentre os quais duas cópias de *nodD* (*nodD1* e *nodD2*), *nodVW*, além de mais dois genes regulatórios de nodulação, *syrM1* e *syrM2*. Uma cascata regulatória descrita por Kobayashi *et al.* (2004), envolve *nodD1*, *nodD2*, *syrM1* e *syrM2* (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Uma característica marcante do genoma de NGR234 é o grande número de genes que codificam para diferentes sistemas envolvidos com a secreção de proteínas e outras moléculas (FREIBERG *et al.*, 1997).

No genoma de NGR234 foram identificados ao todo, 132 genes e proteínas envolvidos com processos de secreção. Dentre estes, está o sistema de secreção tipo III (TTSS). Com todos estes sistemas, NGR234 pode se adaptar rapidamente às mudanças e estímulos ambientais no solo, rizosfera e plantas (SCHMEISSER *et al.*, 2009). A grande riqueza dos sistemas de secreção e a especificidade dos fatores simbióticos produzidos por NGR234 são prováveis causas da ampla gama de hospedeiros (SCHMEISSER *et al.*, 2009; BROUGHTON *et al.*, 2000; PERRET *et al.*, 2000).

### 3.2 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III

O Sistema de Secreção Tipo III é um dos fatores essenciais para a formação dos nódulos simbióticos em linhagens de rizóbios (MARIE *et al.*, 2001). É composto por um complexo de multi-proteínas conservado entre bactérias patogênicas, nas quais foi primeiramente descrito. Além de estar presente em bactérias patogênicas, também está em bactérias simbiotes, funcionando como um mensageiro do procarioto para as células eucarióticas (HUECK, 1998).

Considerada uma maquinaria usada por patógenos para anunciarem seus fatores de virulência aos hospedeiros, este aparato de secreção demonstrou uma função regulatória na interação simbiótica bactéria-leguminosa (MARIE *et al.*, 2001). A maquinaria do sistema é normalmente composta por 20 proteínas variadas que formam um complexo na membrana da bactéria, transpassando as membranas externa e interna, através do qual as proteínas podem transitar para o exterior, sem que haja clivagem proteolítica. Este aparato também pode alcançar a membrana do hospedeiro, permitindo que as proteínas sejam secretadas tanto para o meio extracelular quanto diretamente no citoplasma da célula alvo eucariótica, onde subvertem o funcionamento desta (HUECK, 1998).

Foi observado que TTSS está presente em várias espécies de *Rhizobium*, por exemplo, NGR234, *R. fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* (MARIE *et al.*, 2003), mas há aquelas que não o possuem, como *R. meliloti* 2011 (VIPREY *et al.*, 1998). Nos rizóbios, o TTSS transporta uma ampla variedade de proteínas (Nop e Rhc), tanto para o meio extracelular, quanto para o citoplasma das células eucarióticas, influenciando o processo de infecção para a nodulação. Não se sabe como as bactérias simbióticas adquiriram tais genes, embora haja suspeita de transferência lateral (NGUYEN *et al.*, 2000). Os genes codificadores das proteínas TTSS podem ser cromossomais ou estarem em plasmídeos (MARIE *et al.*, 2001).

TTSS foi identificado no plasmídeo simbiótico pNGR234a, de *Rhizobium sp.* NGR234, após sequenciamento completo (FREIBERG *et al.*, 1997; SCHMEISSER *et al.*, 2009). A seqüência conservada do sistema de secreção tipo III de rizóbios contém 10 ORFs, que são homólogas aos genes *ysc* e *hrc*. As proteínas Ysc, de *Yersinia* e Hrc de patógenos de plantas, são importantíssimas para a secreção dos fatores de virulência destas linhagens. No intuito de diferenciar os sistemas de secreção simbióticos dos patogênicos, os homólogos de *hrc* são chamados de *rhc*. Desta forma, RhcN é homólogo a YscN e HrcN (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2001).

A transcrição dos genes de TTSS em NGR234 ocorre exclusivamente na presença de flavonóides e requer os reguladores NodD1 e TtsI. NodD1 pertence a família LysR de ativadores transcricionais e TtsI faz parte da família de reguladores transcricionais de dois componentes, apesar da aparente ausência do segundo membro do par (VIPREY *et al.*, 1998). A transcrição do gene *ttsI* é dependente de NodD1 e de flavonóide e é expresso tardiamente durante o processo de nodulação (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Seqüências conservadas, chamadas *tts-box*, são encontradas nas regiões promotoras dos genes *rhc* e *nop*, e são ativadas por TtsI.

Onze *tts-boxes* foram identificadas no plasmídeo pNGR234a, na região regulatória de genes que codificam proteínas formadoras do aparato de secreção, de genes codificadores de Nops (Nodulation Outer Proteins) e outros envolvidos com a síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose. Além destes, foi identificado o operon *y4mFE*, envolvido na estabilidade do plasmídeo pNGR234a, que também é regulado por TtsI (VIPREY *et al.*, 1998; KRAUSE *et al.*, 2002; MARIE *et al.*, 2004).

Os genes do sistema de secreção tipo III aparentemente não são expressos durante a simbiose. Uma análise de expressão indicou que a maioria dos genes TTSS não é transcrita ou é em pequenas quantidades, em nódulos de *Vigna unguiculata* e *Cajanus cajan* (PERRET *et al.*, 1999).

NGR234 secreta pelo menos oito proteínas de maneira dependente de TTSS (VIPREY *et al.*, 1998). Em bactérias patogênicas as proteínas secretadas nem sempre exibem diretamente propriedades contra o hospedeiro. Algumas delas são acessórias e sua função, por exemplo, pode ser translocar os fatores de virulência. Neste caso transportam proteínas bacterianas através da membrana plasmática e da parede celular do hospedeiro para o citosol da célula alvo (HUECK, 1998).

Abolir a secreção de proteínas pode afetar a formação de nódulos de várias maneiras: inibir a formação de nódulos, reduzir ou aumentá-la (VIPREY *et al.*, 1998). Além disso, dependendo da planta estudada, as proteínas secretadas podem ter efeitos variáveis, o que pode ser explicado pelo fato de diferentes flavonóides (moduladores dos níveis de expressão das proteínas secretadas) serem produzidos por cada planta. As proteínas secretadas podem ser reconhecidas pelas plantas em diferentes graus e algumas espécies podem não possuir receptores corretos para os Nops, reconhecendo-os como fatores de virulência, ocasionando uma resposta de defesa e não um processo simbiótico (MARIE *et al.*, 2001; VIPREY *et al.*, 1998).

A maior variação fenotípica após a inoculação com as linhagens de NGR234 foi observada em *Crotalaria juncea*. A estirpe selvagem induz a formação de nódulos ineficientes, enquanto os mutantes apresentam nódulos eficientes. Isso pode ser explicado porque neste caso as proteínas secretadas induzem uma resposta de defesa na planta, não permitindo que a bactéria simbiótica infecte a raiz (MARIE *et al.*, 2001).

O gene *rhcN* codifica uma proteína com características de ATPase, responsável por fornecer energia ao aparato de secreção. Plantas de espécies diferentes manifestam fenótipos diferentes quando inoculadas com este mutante. Comparando seu efeito com o do selvagem NGR234, em *P. tuberosus* o *rhcN* proporciona um grande aumento na nodulação e o oposto ocorre em *T. vogelii*, já que neste caso ele diminui a formação de nódulos. A infecção de *P. tuberosus* com o mutante *rhcN* demonstra que há o efeito deletério das proteínas exportadas

através do TTSS, já que é o selvagem que proporciona uma maior nodulação. Por outro lado, *T. vogelli* aparenta necessitar a secreção das proteínas para otimizar a nodulação (VIPREY *et al.*, 1998).

Em *B. japonicum* USDA110 foi observada a presença de homólogos de genes *avr*, os quais codificam proteínas acessórias determinantes de maior virulência dos patógenos de plantas. O efetor YopJ, de *Yersinia* é um exemplo de proteína Avr, que atua como protease (ORTH *et al.*, 2000; BONAS; VAN DEN ACKERVEKEN, 1999). Aminoácidos conservados, envolvidos com esta atividade, foram identificados em YopJ e foram submetidos a mutações em sua seqüência, confirmando que estes são essenciais para sua função. Em NGR234, a proteína homóloga, NopJ também possui os mesmos aminoácidos conservados, sugerindo que possui a mesma função. Uma mutação nas seqüências conservadas de aminoácidos no gene *nopJ* pode propiciar uma maior nodulação na planta em relação ao selvagem (ORTH *et al.*, 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTRATÉGIA GERAL

*Phaseolus vulgaris* foi cultivado em condições estéreis e inoculado com as diferentes estirpes para obtenção de nódulos, que foram utilizados para a extração do RNA total. Após a produção de cDNA a partir do RNA obtido, foram realizadas reações de PCR com *primers* aleatórios com o objetivo de identificar bandas diferencialmente amplificadas.

### 4.2 RIZÓBIOS E PLANTAS UTILIZADAS

Foram utilizadas três estirpes de rizóbio: o selvagem NGR234 e dois mutantes, *rhcN* e *nopJ*.

A leguminosa utilizada no experimento foi *Phaseolus vulgaris*.

### 4.3 MEIOS DE CULTURA

#### **Meio RMS (*Rhizobium* minimal medium)**

O meio RMS foi preparado a partir das soluções estoque individuais listadas abaixo.

Solução I-A: 205g/L  $K_2HPO_4$ ; 145g/L  $KH_2PO_4$ ; 15g/L NaCl

Solução I-B: 50g/L  $NH_4NO_3$

Solução II: 50g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Solução III: 2.5 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

Solução IV: 123g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 87g/L  $K_2SO_4$ ; 0.34g/L  $MnSO_4$ ; 0,5g/L  $H_3BO_3$ ; 0,29g/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1g/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 0,06g/L  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.05g/L  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

Solução de vitaminas de Gamborg 1000X (Sigma)

Succinato de sódio: 324g/L

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

Preparação de RMS

Para o preparo de 1 litro de meio de cultura foram adicionados 10mL das soluções I-A, I-B e II e 1mL das soluções III, IV e de vitaminas. Como fonte de carbono foram adicionados 10mL de solução de succinato de sódio, nesta ordem (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).

### **Meio TY (Tryptone yeast extract medium)**

O meio TY apresenta a seguinte composição:

Extrato de Levedura 3,0 g/L

$CaCl_2 \cdot H_2O$  0,87g/L

Triptona 5,0g/L

O pH do meio foi corrigido para 6,8 com NaOH 1 mol/L. A esterilização foi realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para o meio TY sólido foi acrescido 1,5% de ágar (BERINGER, 1974).

### **Meio B+D**

O meio B+D, nutritivo para as plantas, foi preparado a partir das soluções estoque individuais, listadas abaixo.

Solução A:  $CaCl_2 \cdot H_2O$  2 mol/L

Solução B<sub>1</sub>:  $KH_2PO_4$  1 mol/L

Solução B<sub>2</sub>:  $K_2HPO_4$  1 mol/L

Solução C:  $FeC_6H_6O_7 \cdot H_2O$  0,02 mol/L

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

Todas as soluções estoques foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão.

Para preparar 10L de B+D deve-se adicionar 5 mL de cada uma das soluções estoque na seguinte ordem: Solução D, Solução B<sub>2</sub>, Solução A, Solução B<sub>1</sub>, Solução C.

O pH foi ajustado para 7.0, utilizando HCl 1 mol/L ou KOH 1 mol/L (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).

#### 4.4 CULTURA E CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES NGR234, nopJ<sup>-</sup> E rhcN<sup>-</sup> DE RIZÓBIOS

As colônias das estirpes de *Rhizobium* sp. NGR234 utilizadas neste trabalho foram isoladas com alça em placas de petri contendo meio TY sólido, com os antibióticos adequados e incubadas à 28°C. Depois de isoladas, algumas colônias foram selecionadas e cultivadas em meio TY líquido à 28°C sob agitação, com os antibióticos correspondentes. Após crescimento das células inoculadas, estas foram conservadas em glicerol 50%, a uma temperatura de -20°C.

#### 4.5 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO DE CULTIVO DAS PLANTAS

O substrato utilizado para o cultivo das plantas foi vermiculita expandida, porque esta não apresenta nenhum nutriente que pudesse interferir no desenvolvimento da planta. A vermiculita foi lavada com água corrente em abundância por 3 a 4 horas e escorrida por várias horas, para remover o excesso de água.

#### 4.6 PREPARAÇÃO DOS POTES DE CULTIVO DE *Phaseolus vulgaris*

Os potes de cultivo, conhecidos como vasos de Leonard, consistem em dois recipientes, superior e inferior, que se encaixam. O recipiente superior possui uma abertura no fundo, por onde passa uma tira de papel filtro, que fica em contato com o meio de cultura para as plantas (B+D), presente no compartimento inferior, com a finalidade de manter o substrato umedecido.

O substrato é colocado no recipiente superior, que então é fechado com uma tampa. O pote montado é autoclavado para posteriormente receber as plântulas.



FIGURA 1: *Phaseolus vulgaris* SENDO CULTIVADO EM VASO DE LEONARD

#### 4.7 ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris*

Foram escolhidas 35 sementes de *P. vulgaris* variedade BAT93. Anteriormente à germinação, foi necessário esterilizá-las, eliminando desta forma qualquer microorganismo existente no tegumento. A esterilização foi realizada em capela, utilizando-se ácido sulfúrico concentrado, no qual as sementes foram mantidas durante 10 minutos, sob agitação esporádica. Em seguida o ácido foi removido e as sementes foram enxaguadas em água Mili-Q estéril. As sementes foram lavadas no mínimo dez vezes com água Mili-Q estéril, no fluxo.

#### 4.8 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Após terem sido esterilizadas, onze a doze sementes foram distribuídas equidistantemente em três placas de petri, contendo meio B+D acrescido de 1,5% de ágar. As placas foram envolvidas com papel alumínio e em seguida incubadas a 25°C durante dois dias, até que as raízes apresentassem aproximadamente 2 cm.

#### 4.9 TRANSFERÊNCIA DAS SEMENTES PARA OS POTES DE CULTIVO

Em ambiente estéril, as sementes germinadas foram transferidas para os 29 potes de cultivo, devidamente preparados. Uma pequena abertura era feita no substrato e as sementes germinadas eram introduzidas com as radículas voltadas para baixo. Os potes eram fechados e levados até uma casa de vegetação, com controle de temperatura e luz. A temperatura era mantida a 28°C e o fotoperíodo era de doze horas. Os potes ficaram fechados na casa de vegetação durante dois dias, até as sementes germinadas se tornarem plântulas. Posteriormente, foram levadas para o laboratório, onde receberam o inóculo.

#### 4.10 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

Para a obtenção dos inóculos, as diferentes estirpes foram cultivadas em meio TY+Rif líquido, sob agitação a 28°C, pelo período de doze horas. Posteriormente, as células foram inoculadas em meio mínimo RMS, sem antibióticos. Após 24h de crescimento a densidade óptica (D.O.) das culturas foi determinada por espectrofotometria. Os inóculos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes com sulfato de magnésio 10mM, ajustando-se a D.O. para 0,7. As amostras foram então

diluídas 10X na mesma solução para se obter um número aproximado de  $10^8$  células por mililitro.

Após a preparação dos inóculos e crescimento das plântulas, os rizóbios foram inoculados nas raízes das plantas. Dos vinte e nove potes preparados, quatorze deles foram inoculados com NGR234, sete com *nopJ*, sete com *rhcN* e um pote, por ser o controle negativo, não recebeu inóculo. Em cada pote, 300 µl de inóculo foram introduzidos com o pipetador, bem próximos à radícula da plântula, no interior do substrato. Na seqüência, bolinhas de polipropileno estéreis foram colocadas sobre o substrato como proteção contra contaminantes.

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

Após sete semanas de cultivo, os potes foram abertos e os nódulos, coletados, contados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em gelo seco até serem armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Durante a coleta, cortava-se a parte aérea das plantas próximo da raiz, para posterior pesagem.

#### 4.11 EXTRAÇÃO DE RNA

Devido à instabilidade da molécula de RNA, o local foi preparado para a extração, limpando-se tudo com água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), para eliminar possíveis RNases. O local e os materiais eram para uso exclusivo com RNA.

O RNA presente nos nódulos, conservados à  $-80^{\circ}\text{C}$  foi extraído utilizando-se o kit "Spectrum™ Plant Total RNA Kit" (Sigma Aldrich), conforme as orientações do fabricante, descritas abaixo.

#### 4.12 INSTRUÇÕES DE PREPARO PARA EXTRAÇÃO DE RNA

Os nódulos coletados foram macerados em nitrogênio líquido utilizando-se pistilo e gral, até virarem um fino pó. Em seguida, aproximadamente 100 mg do tecido macerado foi pesado em um microtubo de 2 ml e adicionou-se 500 µl de solução de Lise contendo 2-mercaptoetanol, conforme instruções do fabricante.

A mistura foi agitada com vigor no vortex durante 30 segundos e em seguida foi incubada a 56°C por 3-5 minutos. Após centrifugação por 3 minutos em velocidade máxima (13000 rpm) o sobrenadante foi transferido para a Coluna de Filtração e centrifugado por 30 segundos. Ao eluato foram adicionados 500 µl da Solução de Ligação e a solução resultante foi transferida para a Coluna de Ligação, que foi centrifugada em velocidade máxima durante um minuto, para que o RNA ficasse adsorvido à coluna.

Durante a purificação do RNA a maior parte de DNA é eliminada, porém para aplicações muito sensíveis como RT-PCR, a completa remoção de DNA é necessária. Devido a isto, durante a purificação, foi utilizado o reagente “On-Column DNase I Digest Set”, de acordo com as recomendações do fabricante, contidas no próprio manual do kit. Após a digestão com DNase I, foram pipetados 300µl de Solução de Lavagem I na Coluna de Ligação e centrifugou-se o tubo em velocidade máxima durante 1 minuto.

Após sucessivas lavagens do RNA ligado à coluna, os tubos foram centrifugados para a remoção completa das soluções e o RNA foi eluído em tubo novo. O RNA obtido foi analisado em gel de agarose e quantificado utilizando-se Nano Drop.

#### 4.13 PREPARO DOS PRIMERS

Os 24 *primers* arbitrários do kit, liofilizados, estavam contidos em uma placa. O restante dos reagentes estava armazenado separadamente. Antes da utilização, os *primers* arbitrários (0.5 nmol de cada) foram dissolvidos em 50 µl

de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.001 mM EDTA). Cada *primer* dissolvido foi armazenado em um microtubo e posteriormente foram congelados a uma temperatura de -20°C. O *primer* ACP (*anchor primer*) e um par de *primers* universais já estavam suplementados com tampão TE em tubos individuais.

#### 4.14 SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA ATRAVÉS DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

As reações de transcrição reversa foram preparadas utilizando-se 2 µg de RNA purificado a partir dos nódulos induzidos pelas três diferentes estirpes. A estas, foram adicionados 40 pmol do *primer* ACP *Anchor Primer*, que anela nas caudas Poli A dos mRNAs presentes na amostra.

Em seguida os tubos foram levados a um termociclador, onde ficaram durante dez minutos sob uma temperatura de 70°C, para que as estruturas secundárias da molécula de RNA fossem desfeitas.

Os tubos foram removidos do termociclador, deixados no gelo durante um minuto e a cada um foi adicionado uma mistura contendo:

- 4,2 µl de água fornecida pelo kit
- 1 µl de tampão 10X para MMLV-RT
- 0,4 µl de mistura de deoxiribonucleotídeo 10 mM
- 0,2 µl de inibidor de RNase
- 0,2 µl M-MLV-RT

Os tubos foram homogeneizados e levados até um termociclador, com a programação abaixo, recomendada pelo fabricante:

- 42°C por 90 minutos
- 94°C por 2 minutos

#### 4.15 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *P. VULGARIS*

O DNA de *P. vulgaris* foi extraído para ser utilizado como controle positivo em reações de PCR. Pedacos da folha foram macerados dentro de um microtubo, contendo 300 µl de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH8,0; 70 mM EDTA; 2 M NaCl). Posteriormente 320 µl da suspensão foram transferidos para um novo microtubo. Adicionou-se 20 µl de SDS 10% e o tubo foi incubado durante 30 minutos sob uma temperatura de 60°C. Após isso, o tubo foi resfriado e acrescentou-se 70 µl de clorofórmio. A mistura foi centrifugada em velocidade máxima durante 15 minutos e então 300 µl do sobrenadante foram colocados em um novo microtubo. Posteriormente, 300 µl do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, acrescentando-se também 200 µl de acetato de amônio 7,5 M e 400 µl de isopropanol. A nova mistura foi homogeneizada, lentamente, por inversão do tubo, observando-se a formação de um precipitado. O tubo foi novamente centrifugado por 15 minutos e então o sobrenadante foi descartado. Por fim, acrescentou-se ao *pellet* etanol 70-80%, centrifugou-se durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi deixado para que secasse e quando pronto, foi ressuspenso com 30 µl de água Mili-Q estéril.

#### 4.16 REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA

As reações de PCR foram realizadas com o cDNA produzido, utilizando-se primers aleatórios contidos no Kit Sigma, na tentativa de amplificar cDNAs presentes em alguma das amostras, mas ausente em outras.

Diferentes marcas de reagentes foram testadas e também variadas condições de PCR. As diferentes condições foram basicamente alteradas a partir das recomendadas pelo fabricante, listadas abaixo:

Mix	Programa no Termociclador
13 µl de água	Desnaturação - 95°C, por 4 minutos
2 µl de tampão	30 Ciclos de PCR

1 µl de MgCl <sub>2</sub>	Desnaturação - 94°C, por 1 minuto
0.5 µl de dNTP	Anelamento – 60°C, por 20 segundos
0.5 µl de primer ACP	Extensão – 72°C, por 20 segundos
1 µl de Taq polimerase	1 Ciclo
1 µl de molde de cDNA	Extensão final – 72°C, por 5 minutos

As modificações realizadas durante as PCRs podem ser observadas na tabela 1.

#### 4.17 ELETROFORESE

Para a visualização dos produtos obtidos nas reações de PCR, foram feitas eletroforeses em gel de ágar 1%, preparado em tampão TBE 1X (10X Tris 107,81 g/L; 0,89 mol/L M; EDTA 5,8 g/l 0,02 mol/L; Ácido Bórico 55 g/l 0,89 mol/L ).

Após a corrida, os fragmentos eram corados por imersão do gel em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados.

TABELA 1 – PCRs REALIZADAS

PCRs	Taq's				
	Sigma	Eppendorf	Fermentas	Pfx	Clontech
1 <sup>a</sup>	Programa e mix propostos pelo fabricante	-	-	-	-
2 <sup>a</sup>	-	Programa e mix propostos pelo fabricante	-	-	-
3 <sup>a</sup>	-	Programa inicial com 31 ciclos de PCR Mix proposto pelo fabricante	Programa inicial com 31 ciclos de PCR Mix proposto pelo fabricante	Programa inicial com 31 ciclos de PCR Mix proposto pelo fabricante	-
4 <sup>a</sup>	-	-	Programa inicial com 31 ciclos de PCR, anelamento 52°C Mix proposto pelo fabricante	-	-
5 <sup>a</sup>	-	-	Programa anterior e mix anterior, testando os diferentes tampões: sulfato e cloreto	-	-
6 <sup>a</sup>	-	-	-	-	Programa anterior e mix II <sup>1</sup> com tampão Advantage
7 <sup>a</sup>	-	-	-	-	Programa II <sup>2</sup> , mix anterior, com 0,15µl de Taq. Testados: mix anterior, mix tampão AS e mix 0,7µl cDNA.
8 <sup>a</sup>	-	-	-	-	Programa inicial, com 29 ciclos e mix com 0,15µl de Taq

FONTE: O autor (2009)

NOTA: Mix II<sup>1</sup> corresponde à 19 µl de água; 2.5 µL de Tampão Advantage (10 X Advantage 2 Buffer); 1 µL de cDNA; 0.5 µL de primer ACP; 1 µL de primers aleatórios; 1 µL de dNTP; 0.25 µL de Polimerase

Programa II<sup>2</sup> corresponde à: 1º Ciclo - Desnaturação 15°C, 2 minutos; Anelamento 52°C, 3 minutos; Extensão 68°C, 2 minutos; 31 Ciclos de PCR – Desnaturação 95°C, 15 segundos; Anelamento 65°C, 30 minutos; Extensão 68°C, 90 minutos.

## 5 RESULTADOS

A procura por genes diretamente envolvidos nos mecanismos que levam a planta a reconhecer bactérias patogênicas ou benéficas encontra-se estagnada em decorrência de falta de modelos ideais para a procura de tais genes e de dificuldades técnicas.

Considerando o grande interesse em se entender os mecanismos envolvidos no processo simbiótico planta-bactéria, este trabalho teve como objetivo principal a prospecção por genes diferencialmente expressos durante a interação entre estirpes de *Rhizobium* que nodulam de forma eficiente ou ineficiente *Phaseolus vulgaris*. Para tanto, raízes de *P. vulgaris* foram inoculadas com três estirpes diferentes de *Rhizobium* (NGR234, *nopJ* e *rhcN*). Os nódulos formados foram utilizados para a extração de RNA, com o qual se fez transcrição reversa. Com o cDNA produzido a partir da transcrição reversa, foram realizadas reações de PCR com primers aleatórios, com o objetivo de amplificar genes diferencialmente expressos entre as três estirpes. As linhagens mutantes possuem mutações em genes que codificam para proteínas do sistema de secreção tipo III, que tem importante participação no processo de reconhecimento planta-patógeno ou planta-simbionte (GALÁN; WOLF-WATZ, 2006). Resultados anteriores (Lariguet, P.) de ensaios de nodulação mostraram que as estirpes *rhcN* e *nopJ* interagem com *P. vulgaris* de forma muito mais eficiente que a estirpe selvagem NGR234. Tal diferença deve ser decorrente de alterações nos mecanismos de reconhecimento entre planta e bactéria, onde as estirpes mutantes passaram a ser melhor toleradas pela planta. Provavelmente, mecanismos de defesa da planta não foram elicitados por estas estirpes, o que culminou num maior número de eventos eficientes na colonização, produzindo muitos nódulos.

## 5.1 ENSAIOS DE NODULAÇÃO

Para a obtenção de nódulos induzidos pelas três estirpes de *Rhizobium*, *P. vulgaris* foi cultivado em condições estéreis e posteriormente inoculado com as mesmas, conforme descrito nos itens 4.4 – 4.10.

Após sete semanas de cultivo, os 29 vasos de Leonard contendo as plantas foram levados ao laboratório para a coleta, contagem e pesagem de seus nódulos. Conforme observado anteriormente (Lariguet, P., dados não publicados), as plantas com maior número de nódulos foram aquelas que receberam o inóculo de *rhcN* ou de *nopJ*, enquanto as que receberam o inóculo da estirpe selvagem, produziram poucos nódulos e as que não receberam qualquer inóculo, não produziram nódulos, conforme era esperado (dados não mostrados).

Observa-se que os mutantes *rhcN* e *nopJ* induziram um maior número de nódulos por planta (FIGURA 2). Apesar disto, o peso médio da parte aérea das plantas com o inóculo *rhcN* e *nopJ* é semelhante ao peso médio das plantas inoculadas com NGR234 (FIGURA 3).

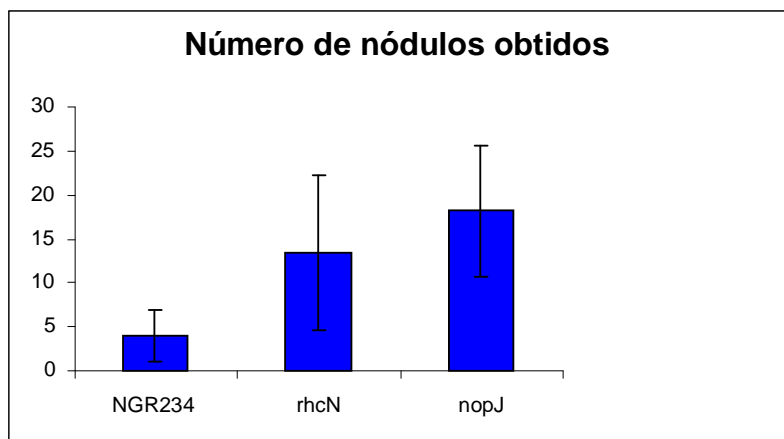


FIGURA 2- NÚMERO DE NODULOS POR PLANTA INOCULADA COM DIFERENTES ESTIRPES DE *Rhizobium* sp. NGR234

FONTE: O autor (2009)

O maior número de nódulos produzidos por uma estirpe resulta em maior crescimento da planta. Nas condições testadas, as plantas exibiram crescimento

lento e a variação no crescimento entre plantas inoculadas com as distintas estirpes não foi observada, diferentemente do observado anteriormente por LARIGUET, P.

É provável que esta diferença tenha ocorrido devido às condições inferiores para o cultivo das plantas deste trabalho. Na casa de vegetação disponível, o provável fator limitante do desenvolvimento das plantas foi a baixa intensidade luminosa.

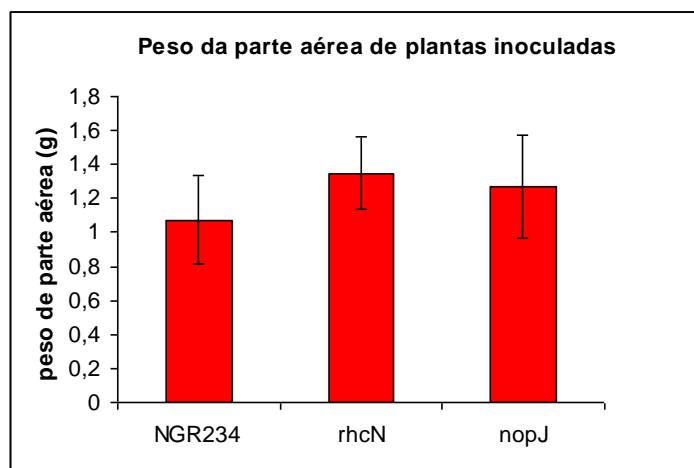


FIGURA 3- PESO DE PARTE AÉREA DAS PLANTAS INOCULADAS COM AS DIFERENTES ESTIRPES DE *Rhizobium* sp. NGR234. FONTE: O autor (2009)

## 5.2 EXTRAÇÃO DE RNA DOS NÓDULOS

Após coleta, os nódulos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para que o RNA, uma molécula muito suscetível a degradação, fosse preservado. No dia seguinte, os nódulos foram macerados em nitrogênio líquido e o RNA foi extraído utilizando-se o kit "Spectrum™ Plant Total RNA Kit", seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi verificada através de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% (FIGURA 4). Pode-se observar na foto do gel, duas bandas mais intensas, correspondentes as moléculas de RNA ribossomal. Com o objetivo de certificar que não havia DNA contaminante nas amostras de RNA, uma alíquota de cada amostra foi tratada com DNase e após o tratamento, foi feita uma nova corrida eletroforética. O perfil observado após o tratamento era o mesmo que antes do tratamento, confirmando que não havia DNA contaminante nas amostras (não mostrado).

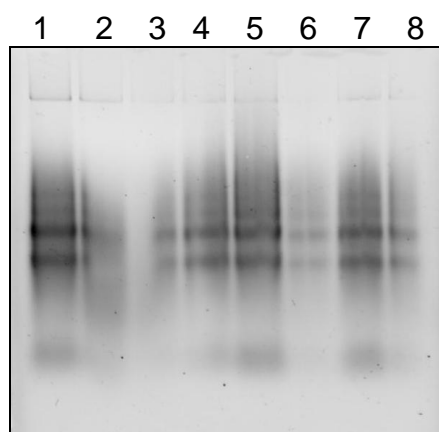


FIGURA 4 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RNA TOTAL EXTRAÍDO A PARTIR DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* INDUZIDOS POR NGR234 E SUAS ESTIRPES *rhcN* E *nopJ*.

FONTE: O autor (2009)

Amostras 1, 2 e 3: NGR234; Amostras 4, 5 e 6: *rhcN*; Amostras 7, 8: *nopJ*.

Além disso, estas amostras de RNA foram utilizadas como molde em reações de PCR, utilizando-se *primers* específicos de *P. vulgaris*. Como controle positivo, utilizou-se DNA extraído da folha de feijão. Ao final da PCR, um novo gel foi corrido e observou-se que somente o controle positivo, cuja amostra era DNA de *P. vulgaris*, havia amplificado. Após este resultado, as amostras de RNA extraído dos nódulos pôde ser utilizada para a produção de cDNA, não necessitando de novo tratamento com DNase (FIGURA 5).

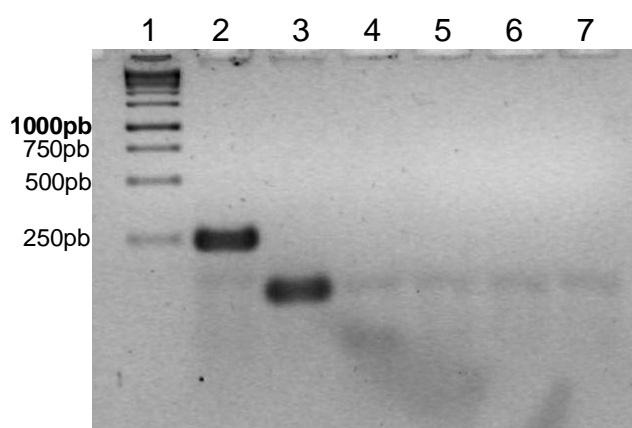


FIGURA 5 – PCR REALIZADA COM gDNA E AMOSTRAS DE RNA TRATADAS E NÃO TRATADAS COM DNASE

FONTE: O autor (2009)

1: marcador molecular; 2 e 3: gDNA de *P. vulgaris* amplificado com os primers de leghemoglobina e actina, respectivamente; 4 e 5: produto de PCR com primers de leghemoglobina em amostras de RNA de *nopJ* tratado e não tratado com DNase, respectivamente; 6 e 7: produto de PCR com primers de actina em amostras de RNA de *rhcN* tratado e não tratado com DNase, respectivamente.

### 5.3 OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR A PARTIR DO RNA EXTRAÍDO

O RNA extraído dos nódulos foi utilizado para a produção de DNA complementar (cDNA), através de transcrição reversa. A comprovação do sucesso da transcrição reversa e obtenção de cDNA foi observada após a realização de PCRs, utilizando o cDNA produzido e o par de *primers* que anelam no gene codificador de leghemoglobina. Na figura 6 pode-se observar os produtos obtidos, tanto a partir do DNA genômico de *P. vulgaris* quanto de uma amostra de cDNA. Uma vez que cada um dos primers do par anela em um éxon diferente, separados por um pequeno íntron, os produtos observados são de tamanho diferentes, confirmando a obtenção de cDNA.

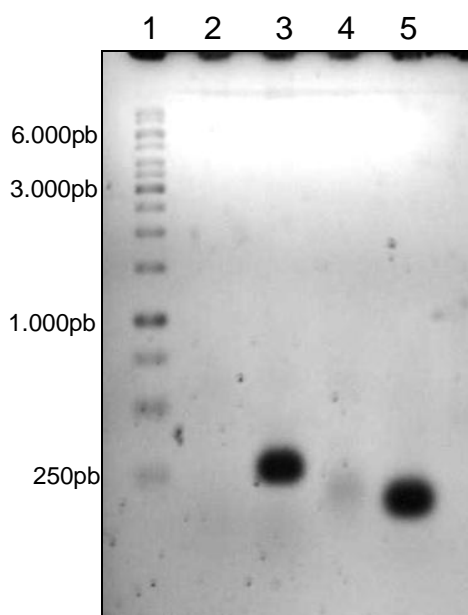


FIGURA 6 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO GENE DE LEGHEMOGLOBINA A PARTIR DE gDNA E cDNA DE *P. vulgaris*

FONTE: O autor (2009)

1: marcador molecular; 2: amostra de gDNA de *P. vulgaris* após PCR com os primers A20 e ACP; 3: Amostra de gDNA de *P. vulgaris* após PCR com os primers Leg for e Leg rev; 4: amostra de cDNA de *rchN* após PCR com os primers A20 e ACP; 5: amostra de cDNA de *rchN* após PCR com os primers Leg for e Leg rev.

#### 5.4 PROSPECÇÃO DE REGIÕES DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS

O cDNA obtido a partir das três amostras pode conter uma composição de produtos diferentes, uma vez que o perfil de expressão gênica nas amostras depende da diferente eficiência de colonização.

Foram realizadas diversas reações de PCR, com *primers* aleatórios, no intuito de observar bandas diferencialmente expressas entre as plantas inoculadas com as diferentes estirpes. Uma vez que não foram obtidos produtos de amplificação após a primeira PCR, diferentes condições foram testadas com o objetivo de se identificar a causa de tal resultado negativo. Para avaliar se os reagentes utilizados na PCR (Sigma) não apresentavam problemas, utilizamos reagentes de um segundo fornecedor (Eppendorf).

O resultado da PCR foi observado em gel de ágar 1% (FIGURA 7). A PCR realizada com reagentes Sigma apresentou bandas muito fracas no gel, enquanto a PCR realizada com os reagentes Eppendorf apresentou bandas mais evidentes, porém pouco definidas. A utilização de agarose 1% e coloração com corante de maior sensibilidade (GelRed) não permitiu uma melhora nos resultados.

Devido à dificuldade em se observar bandas definidas no gel, diversas condições foram testadas, incluindo, diferentes polimerases e tampões, aumento e diminuição no número de ciclos, aumento na temperatura de anelamento dos *primers*, diminuição na concentração de cDNA molde. Nenhuma das condições testadas produziu resultados satisfatórios (dados não mostrados).

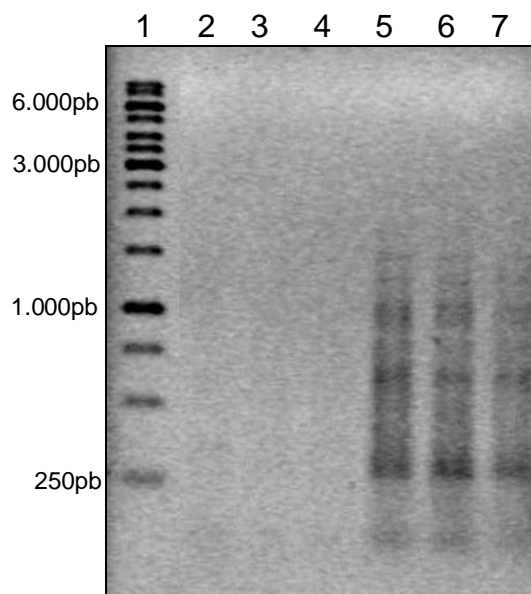


FIGURA 7 – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDOS POR PCR UTILIZANDO REAGENTES DE DIFERENTES FORNECEDORES

FONTE: O autor (2009)

1: marcador molecular; 2, 3, 4: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ*, respectivamente, amplificados com reagentes Sigma e primer A24; 5, 6, 7: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ*, respectivamente, amplificados com reagentes Eppendorf e primer A24.

Para avaliar se a qualidade de cDNA produzido era a causa do perfil insatisfatório das reações de PCR, foram alteradas as condições de preparação do cDNA. A diminuição da concentração de RNA total e aumento na quantidade de transcriptase reversa e tempo de incubação produziu resultados melhores.

Na figura 8 pode-se observar uma foto de gel de agarose 1,5% após corrida eletroforética de amostras de PCR utilizando o cDNA produzido.

Utilizando-se novamente o cDNA produzido com alterações no protocolo, foram feitas PCRs com reagente Clontech de acordo com o protocolo anterior, testando-se 4 novos primers: A16, A17, A18 e A19. Em gel de agarose 1,5% observou-se novamente a presença de possíveis bandas diferenciais (FIGURA 9).

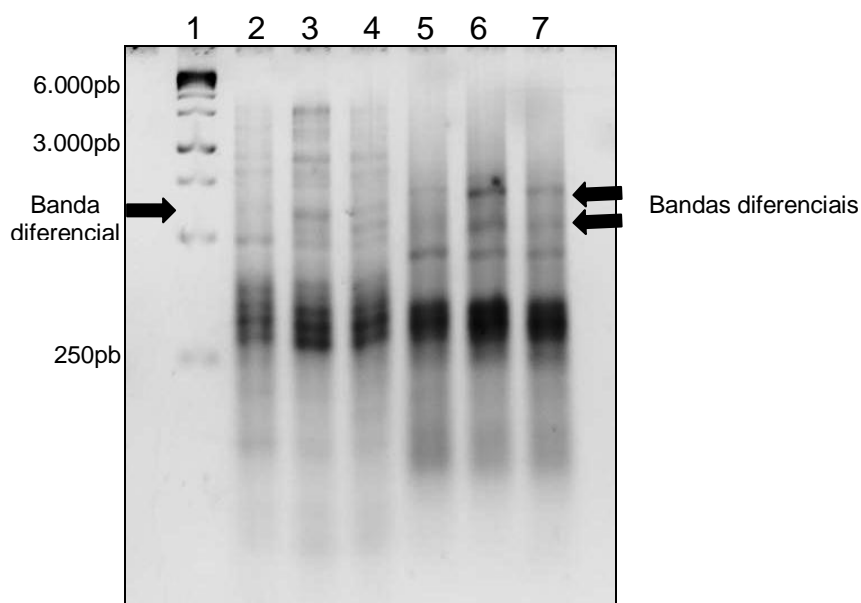


FIGURA 8 – PERFIL ELETROFORÉTICO APÓS PCR COM cDNA DE NÓDULOS DE *P. vulgaris*  
 FONTE: O autor (2009)

1: marcador molecular; 2, 3, 4: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ* respectivamente amplificados com o primer A23, com reagente Fermentas; 5, 6, 7: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ*, respectivamente amplificados com o primer A23, com reagente Clontech.

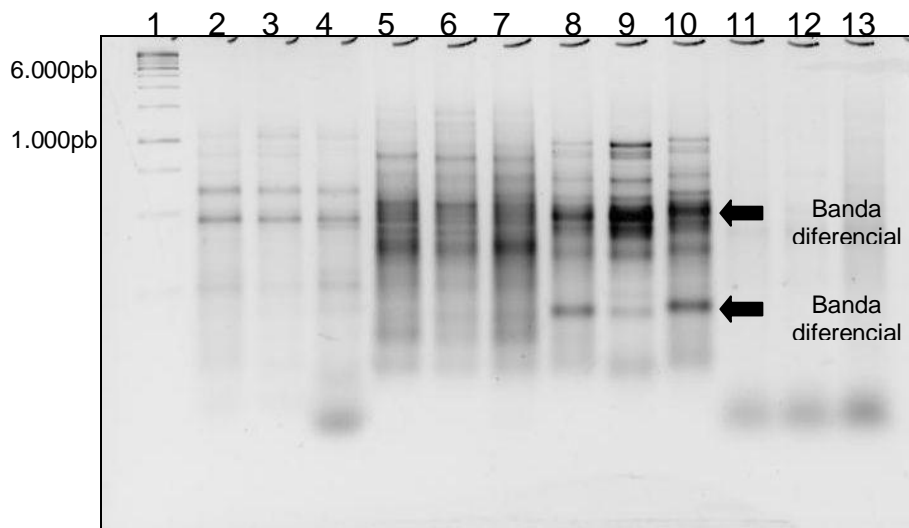


FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO APÓS PCR COM cDNA DE NÓDULOS DE *P. vulgaris*  
 FONTE: O autor (2009)

1: marcador molecular; 2, 3, 4: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ* respectivamente amplificados com o primer A16; 5, 6, 7: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ* respectivamente amplificados com o primer A17; 8, 9, 10 cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ* respectivamente amplificados com o primer A18; 11, 12, 13: cDNA de NGR234, *rchN* e *nopJ* respectivamente amplificados com o primer A19.

## 6 DISCUSSÃO

O bacilo gram-negativo *Rhizobium* sp. NGR234, capaz de secretar proteínas através do Sistema de Secreção Tipo III, de sintetizar variados fatores Nod e produzir lipopolissacarídeos ricos em ramnose, possui um amplo número de hospedeiros (PUEPPKE; BROUGHTON 1999; MARIE *et al.*, 2003), dentre eles *P. vulgaris*. Quando a secreção de proteínas é abolida, a formação de nódulos pode ser afetada ocasionando a inibição, redução ou aumento da formação de nódulos (VIPREY *et al.*, 1998). As plantas secretam flavonóides diferentes, portanto as respostas simbióticas entre as diferentes estirpes e plantas variam (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2001).

Na interação com *P. vulgaris*, NGR234 induz poucos nódulos por planta. Em *Pachyrhizus tuberosus*, a inoculação com NGR234 também induz a formação de poucos nódulos simbióticos (VIPREY *et al.*, 1998). Nestas duas plantas e também em *Crotalaria juncea*, Nops aparentam ser deletérios (MARIE *et al.*, 2003; MARIE *et al.*, 2004).

O mutante *nopJ* porém, induz a formação de um número significativamente maior de nódulos do que NGR234. Este aumento no número de nódulos resulta em plantas maiores, possibilitando inferir que NopJ é interpretado negativamente por *P. vulgaris*, assim como em *Lablab purpureus* (MARIE *et al.*, 2003).

Na interação com *P. tuberosus*, o mutante *rhcN* nodula as raízes das leguminosas com muita eficiência, diferentemente do observado na interação com o selvagem (MARIE *et al.*, 2004). O mesmo ocorre com *P. vulgaris*, que na interação com *rhcN* produziu um número de nódulos maior do que nas interações com as outras duas estirpes.

Esses diferentes fenótipos, decorrentes da supressão de secreção de Nops sugere que a planta possui mecanismos que reconhecem as Nops como um sinal positivo ou negativo. Quando a supressão da secreção produz uma estirpe mais eficiente na nodulação, conclui-se que esta sinaliza para a planta que tal bactéria não deve ser aceita, podendo ser considerada como prejudicial. Quando a supressão de uma Nop produz uma estirpe menos eficiente, esta Nop deve ter função sinalizadora de uma bactéria benéfica. Uma vez que as funções das Nops

permanecem desconhecidas em quase todas as espécies, a identificação de potenciais alvos na planta é dificultada por qualquer abordagem teórica.

Dessa forma, abordagens de prospecção de genes candidatos de larga escala são uma alternativa que, apesar de alto risco de insucesso, permitirão a identificação dos alvos.

Uma opção para identificar genes alvo é analisar a expressão gênica através do monitoramento de mudanças nos níveis de RNA (transcriptoma). Desta forma, a estratégia experimental deve abordar a investigação de vários genes paralelamente e não mais uma investigação segmentada dos genes individualmente (PÜHLER *et al.*, 2004).

Obter RNA de alta qualidade não é um processo simples, já que a molécula tem grandes chances de degradação, devido a ação das inúmeras RNases, muito estáveis, presentes no ambiente e na amostra. Neste trabalho o RNA foi extraído com o kit “Spectrum™ Plant Total RNA Kit” e verificou-se através de corrida eletroforética a condição do RNA, confirmando que este estava em boas condições para uso, apresentando bandas intensas correspondentes ao RNA ribossômico. A partir do RNA obtido foi possível produzir cDNA, posteriormente amplificado com *primers* aleatórios. Buscou-se o padrão diferencial de bandas entre as três estirpes, abordando desta forma a investigação paralela de vários genes.

Após inúmeras modificações no protocolo fornecido pelo fabricante dos kits utilizados e também após consulta ao protocolo do fornecedor Seegene, antigo fabricante, foram obtidos melhores resultados. Com as condições estabelecidas, iniciamos a busca por regiões diferencialmente amplificadas entre as amostras.

Dos 24 *primers* aleatórios existentes, foram utilizados os *primers*: A1, A2, A16, A17, A18, A19, A22, A23 e A24.

Apesar de o perfil de amplificação ser parcialmente mascarado pelo arraste obtido, foi possível visualizar bandas diferenciais entre as amostras. Devido a falta de tempo para a continuidade dos experimentos, os produtos de PCR obtidos foram armazenados para análises posteriores.

As bandas serão extraídas do gel e purificadas para clonagem e seqüenciamento. Após a identificação dos genes diferencialmente amplificados será necessário a confirmação de que estes são expressos em diferentes taxas. Desta forma será possível certificar-se de que realmente se tratam de genes envolvidos

com a resposta aos efetores do sistema TTSS de *Rhizobium* sp. NGR234 (VITERBO; HAREL; CHET; 2004).

## 7 CONCLUSÕES

*Phaseolus vulgaris* quando inoculado com NRG234 apresenta poucos nódulos simbióticos.

A estirpe *nopJ* induz a formação de um número de nódulos maior do que na interação com NGR234, sugerindo que NopJ é reconhecido como um fator negativo por *P. vulgaris*.

A estratégia de amplificação diferencial de cDNAs é eficiente para a detecção de genes diferencialmente expressos.

## REFERÊNCIAS

AUSMEES, N.; KOBAYASHI, H; DEAKIN, W. J.; MARIE, C.; KRISHNAN, H.B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Characterization NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234.** Journal of Bacteriology, v.186, n. 14, p. 4774-4780, jul. 2004.

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

BONAS, U.; VAN DEN ACKERVEKEN G. **Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance.** Current Opinion Microbiology n.2, p. 94-98, 1999.

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

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

COOPER, J.E. **Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue.** Journal of Applied Microbiology ISSN, v. p. 1364-5072, 2007.

DENARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; ROSEMBERG, C. **Signalling and Host Range Variation in Nodulation.** Annual Review of Microbiology, v. 46, p. 497-531, 1992.

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

GALÁN J. E.; WOLF-WATZ H. **Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines.** Nature, v. 444, p. 567-573, 2006.

HANIN, M.; JABBOURI, S.; BROUGHTON, W. J.; FELLAY, R. **SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 Activates Transcription of Symbiotic Loci and Controls the Level of Sulfated Nod Factors.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 11, n. 5, p. 343-350, 1998.

HUECK C.J. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 62, p. 379-433, 1998.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W. **How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model.** *Nature*, v. 5, p. 619-633, Aug. 2007.

JU, X. T.; XING, G. X.; CHEN, X. P.; ZHANG, S. L.; ZHANG, L. J.; LIU, X. J.; CUI, Z. L.; TIN, B.; CHRISTIE, P.; ZHU, Z. L.; ZHANG, F. S. **Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 9, p. 3041-3046, 2009.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W. J.; *et al.* **Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234.** *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 335-347, 2004.

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

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

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. **Characterization of Nops, Nodulation Outer Proteins, Secreted Via Type III Secretion Systems of NGR234.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16, n. 9, p. 743-751, 2003.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; OHANEN-REUHS, T.; DIALLO, E.; REUHS, B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **TtsI, a Key Regulator of *Rhizobium* Species NGR234 Is Required for Type III-Dependent Protein Secretion and Synthesis of Rhamnose-Rich Polysaccharides.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 9, p. 958-966, 2004.

NGUYEN, L.; PAULSEN, I.T.; TCHIEU, J.; HUECK, C.J.; SAIER, M.H. **Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems.** *J Mol Microbiol Biotechnol*, n. 2, p. 125-144, 2000.

ORTH K.; XU Z.; MUDGETT M. B.; BAO Z. Q.; PALMER L. E.; BLISKA J. B.; MANGEL W. F.; STASKAWICZ B.; DIXON J. E.; **Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease.** Science, n. 290, p. 1594-1597, 2000.

PERRET X., FREIBERG C., ROSENTHAL A., BROUGHTON W. J., FELLAY R. **High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp NGR234.** Molecular Microbiology, v. 32, p. 415-425, 1999.

PERRET X., STAEHELIN C., BROUGHTON W. J. **Molecular basis of symbiotic promiscuity.** Microbioly Molecular Biology Review, v.64, p. 180-201, 2000.

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

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GÖTTFERT, M.; MORRISSEY, J. P.; O'GARRA, F. **What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions?** Current Opinion in Plant Biology, v. 7, p. 137-147, 2004.

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

VITERBO A.; HAREL M.; CHET I. **Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots.** FEMS Microbiology Letters, v. 238, p. 151–158, 2004.

VIPREY, V.; DEL GRECO, A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. **Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*.** Molecular Microbiology, v. 26, n. 6, p. 1381-1389, 1998.