

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LUANA TAVARES BARBOSA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Phaseolus vulgaris* ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA A PROTEÍNAS DE NODULAÇÃO (NOPS) DE *Sinorhizobium fredii*
NGR234

CURITIBA
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Phaseolus vulgaris* ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA A PROTEÍNAS DE NODULAÇÃO (NOPS) DE *Sinorhizobium fredii*
NGR234

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseli Wassem

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Barbosa, Luana Tavares

Identificação de genes de *Phaseolus vulgaris* envolvidos na resposta a proteínas de nodulação (Nops) de *Sinorhizobium fredii* NGR234. / Luana Tavares Barbosa. – Curitiba, 2019.

88 p.: il.

Orientadora: Ana Claudia Bonatto

Coorientadora: Roseli Wassem

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Nitrogênio – Fixação. 2. Feijão. 3. Nodulação. I. Título. II. Bonatto, Ana Claudia, 1978-. III. Wassem, Roseli, 1972-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 572.545



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUANA TAVARES BARBOSA** intitulada: **Identificação de genes de *Phaseolus vulgaris* envolvidos na resposta a proteínas de nodulação (Nops) de *Sinorhizobium fredii* NGR234**, sob orientação da Profa. Dra. ANA CLAUDIA BONATTO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Novembro de 2019.


ANA CLAUDIA BONATTO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


EDUARDO BALSANELLI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ROSE ADELE MONTEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


DOUMIT CAMILIOS NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família que sempre mostrou que o estudo é a única forma de crescer como pessoa e nos dá ferramentas para contribuir de forma efetiva na comunidade. Agradeço minha mãe Floriza, irmão Jefferson, tias Mariza, Raquel, Gleide e avó Elza por me incentivarem a sempre buscar novos desafios.

À professora Dr^a Ana Claudia Bonatto, agradeço por ter sido uma mãe científica não só para mim, por me orientar durante esses 4 anos de doutorado, por sempre estar disposta a discutir resultados que pareciam sem explicação. Obrigada pela paciência, ensinamentos e por mostrar que mesmo em tempos sombrios podemos contribuir com a ciência brasileira.

Obrigada pelas ajudas com as 153 mudas de feijão até tarde da noite!!! Obrigada por esses anos, saio uma pessoa e profissional muito melhor.

À professora Dr^a Roseli Wassem, agradeço por ter me ajudado a encontrar soluções quando não sabia mais o que fazer. Obrigada pelos ensinamentos e sugestões no artigo final. Um dia quem sabe entenderei de interação planta-bactéria como você.

Aos meus colegas de laboratório Lucas, Mateus, Paola e Aryel agradeço pelos dias divertidos que compartilhamos no laboratório, que possamos manter essa amizade por muitos anos. Espero continuar sendo marcada em memes no face, twitter e insta. Adorei conhecer vocês.

À pós doutoranda Liziane Brasamarelo dos Santos por me ensinar como trabalhar com RNAseq e me acompanhar como banca de acompanhamento durante este período.

À Ana Luiza Mattana, agradeço por ser essa mãe que acolhe a todos que chegam no laboratório. Obrigada por sempre deixar tudo preparado para eu extrair RNA, contar nódulo e fazer placas. Você tornou esses anos muito mais leve.

Aos meus amigos parnanguaras (bigs), agradeço por sempre estarem na torcida, mesmo não entendendo o que eu fazia. As piadas, saídas e mensagens me ajudaram a lidar com a frustração em muitos momentos desse doutorado. Obrigada por me apoiarem tanto.

Aos meus colegas do programa de pós-graduação, professores e técnicos, agradeço pela convivência e ensinamentos.

À UFPR e a CAPES obrigada por me possibilitarem realizar esse sonho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é o processo onde ocorre a conversão de nitrogênio gasoso em amônia através da atividade do complexo enzimático da nitrogenase presente em bactérias diazotróficas. *Sinorhizobium fredii* NGR234 é uma bactéria capaz de fixar nitrogênio no interior de estruturas conhecidas como nódulos, e apresenta um sistema de secreção tipo III que secreta cinco proteínas efetoras (NopM, NopJ, NopT, NopP e NopL). Estas proteínas provocam modificações na célula vegetal e determinam a eficiência de nodulação de diferentes maneiras dependendo da planta hospedeira. *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) é uma leguminosa com grande importância na alimentação nos países da América Latina e África. O feijão pode se associar a *S. fredii* NGR234 e formar nódulos na raiz, onde ocorre a fixação de nitrogênio. Nesta associação, o sistema de secreção de *S. fredii* NGR234 tem efeito negativo na nodulação de *P. vulgaris*. O processo de nodulação depende do reconhecimento planta-bactéria e envolve uma cascata com várias etapas, incluindo a secreção de flavonóides pelas raízes da planta e a produção de fatores Nod, polissacarídeos e proteínas efetoras (Nops) pela bactéria. Pouco se conhece sobre os aspectos moleculares do reconhecimento das proteínas Nops pela planta. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar os genes de *P. vulgaris* diferencialmente expressos em resposta aos Nops de *S. fredii* NGR234, como também as vias metabólicas em que eles estão envolvidos. Para tanto, o transcriptoma de *P. vulgaris* inoculado com as estirpes selvagem NGR234 e mutantes *nopM*-, *nopJ*- e *rhcN*- foi analisado. As amostras de RNA foram obtidas em duas fases de desenvolvimento do nódulo, com 10 dias (primórdio) e 21 dias (nódulo). As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas, os *reads* gerados foram mapeados no genoma de *P. vulgaris* e os genes foram comparados entre as condições testadas (NGR234 vs *nopJ*-, NGR234 vs *nopM*-, NGR234 vs *rhcN*, *rhcN*- vs *nopJ*-, *rhcN*- vs *nopM*- e *nopJ*- vs *nopM*-) para primórdio e nódulo. Os genes considerados diferencialmente expressos entre as condições (valor de $p \leq 0.05$ e fold-change ≥ 2) foram categorizados quanto a função no programa Mapman v 3.5.1. Os resultados sugerem que os Nops translocados pelo sistema de secreção tipo III de NGR234 no citoplasma de *P. vulgaris* ativam a transcrição de vários genes envolvidos na defesa da planta e resposta ao estresse.

Palavras-chave: Fixação de Nitrogênio, *Sinorhizobium fredii* NGR234, *Phaseolus vulgaris*, Nodulação.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is the process of dinitrogen conversion into ammonia through the activity of the nitrogenase enzyme complex present in diazotrophic bacteria. *Sinorhizobium fredii* NGR234 is a bacterium capable of fixing nitrogen inside structures known as nodules, and presents a type III secretion system that secretes five effector proteins (NopM, NopJ, NopT, NopP and NopL). These proteins cause modifications in the plant cell physiology and determine nodulation efficiency in different ways depending on the host plant. *Phaseolus vulgaris* (common bean) is a legume of great importance for food in Latin America and Africa countries. Beans can associate with *S. fredii* NGR234 and form nodules in the root where nitrogen fixation occurs. In this association, the *S. fredii* NGR234 secretion system has a negative effect on *P. vulgaris* nodulation. The nodulation process depends on the plant-bacteria recognition and involves a cascade of many steps, including flavonoids secretion by plant roots and the production of Nod factors, polysaccharides and effector proteins (Nops) by the bacteria. The molecular aspects of Nops recognition by the host are poorly known. Thus, this work aimed to identify the *P. vulgaris* genes differentially expressed in response to *S. fredii* NGR234 Nops, as well as the metabolic pathways in which they are involved. For this, the *P. vulgaris* transcriptome after inoculation with NGR234 wild-type strain and *nopM*-, *nopJ*- and *rhcN*- mutants was analysed. RNA samples were obtained in two phases of nodule development, 10 days (primordia) and 21 days (nodule). cDNA libraries were sequenced and the reads obtained were mapped into the *P. vulgaris* genome. The genes were compared between the conditions tested (NGR234 vs *nopJ*-, NGR234 vs *nopM*-, NGR234 vs *rhcN*-, *rhcN*- vs *nopJ*-, *rhcN*- vs *nopM*- and *nopJ*- vs *nopM*-) for primordia and nodule samples. Genes differentially expressed between conditions (p value ≤ 0.05 and fold change ≥ 2) were categorized by function in the Mapman v 3.5.1 program. The results suggest that Nops translocated by the NGR234 type III secretion system in the *P. vulgaris* cytoplasm activate the transcription of several genes involved in plant defense and stress response.

Keywords: Nitrogen Fixation, *Sinorhizobium fredii* NGR234, *Phaseolus vulgaris*, Nodulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modelo de interação entre leguminosas e NGR234	22
FIGURA 2. Modelo proposto do Sistema de Secreção Tipo III em NGR234	23
Figure 1. <i>P. vulgaris</i> nodules observed after inoculation with <i>S. fredii</i> NGR234 strains	41
Figure 2. Expression of genes differentially expressed by RNAseq (blue bar) and RT-qPCR (orange bar).	43
Figure 3. Number of <i>P. vulgaris</i> genes up- and down-regulated in response to rhizobial strains in primordia (A) and nodules (B) samples	44
Figure 4. Venn Diagrams	45
Figure 5. Classification of DEGs observed in comparisons between samples obtained from different strains	46
Figure 6. Heatmap of primordia of <i>P. vulgaris</i> DEGs from NGR234 vs <i>rhcN</i> - comparison, categorized into the following classes: hormone synthesis, glutathione S transferase, peroxidase and PR proteins.	47
Figure 7. Differentially expressed genes in primordia x nodule comparisons	51
Figure S1. Principal component analysis (PCA) of transcriptome of all 16 RNAseq libraries.	64
Figure S2. Primordia x nodule DEGs from <i>P. vulgaris</i> inoculated with strain NGR234 wild type <i>rhcN</i> and <i>nopJ</i> strains categorized by Mapman v.3.5.1 program.	65

LISTA DE TABELAS

Table S1. <i>Phaseolus vulgaris</i> genes selected for validation by RT-qPCR	63
Table S2. SUMMARY OF MAPPING OF SEQUENCES OBTAINED FROM PRIMORDIA OF NODULES AGAINST THE GENOME OF <i>Phaseolus vulgaris</i> USING CLC GENOMICS WORKBENCH v 7.5	63
Table S3. SUMMARY OF MAPPING OF SEQUENCES OBTAINED FROM NODULES AGAINST THE GENOME OF <i>Phaseolus vulgaris</i> USING CLC GENOMICS WORKBENCH v 7.5	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	14
2.2 NODULAÇÃO	16
2.3 <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	19
2.4 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III (T3SS)	22
2.5 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS SECRETADAS PELO T3SS	25
2.6 <i>Phaseolus vulgaris</i>	27
2.7 SISTEMA DE DEFESA EM PLANTAS	28
3. JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 ARTIGO	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	38
RESULTS	41
DISCUSSION	52
SUPPLEMENTAL MATERIAL	63
6 DISCUSSÃO FINAL	67
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE	88

1 INTRODUÇÃO

A fixação de nitrogênio consiste em incorporar à biomassa o nitrogênio atmosférico, transformando-o em uma forma combinada que possa ser assimilada pelos seres vivos. Esse processo denomina-se Fixação Biológica de Nitrogênio e é realizada por bactérias chamadas de diazotróficas (POSTGATE, 1998). Essas bactérias apresentam o complexo enzimático da nitrogenase, que catalisa a reação de redução do nitrogênio gasoso (N_2) à amônia (NH_3), um composto nitrogenado que fica disponível para outros organismos. As bactérias diazotróficas do grupo dos rizóbios induzem a formação de estruturas específicas chamadas nódulos, onde ocorre sua multiplicação e fixação de nitrogênio.

A bactéria gram-negativa *Sinorhizobium fredii* NGR234 encontrada no solo é um diazotrofo capaz de se associar às raízes de 112 gêneros de leguminosas e uma não leguminosa *Parasponia andersonii*, formando nódulos onde fixa o nitrogênio atmosférico. Para que ocorra a formação do nódulo, é necessário que ocorra o reconhecimento entre as espécies envolvidas. A planta secreta flavonoides e em resposta, a bactéria produz fatores Nod, além de outros elementos como exopolissacarídeos (EPS) e Nops (Nodulation outer proteins) (LÓPEZ-BAENA et al., 2016).

S. fredii NGR234 apresenta a maioria dos genes responsáveis pela produção de fatores Nod distribuída em cinco operons, cada um controlado por um *nod*-box diferente (KOBAYASHI et al., 2004). Esses genes são altamente conservados tanto na sequência de DNA como na sua função (MARTÍNEZ et al., 1990), a produção de fatores Nod. Além disso, NGR234 possui cinco proteínas efetoras (NopM, NopT, NopJ, NopL e NopP) que são secretadas para o citoplasma da planta pelo sistema de secreção tipo III, induzindo algumas respostas na planta hospedeira (BARTSEV et al., 2004). A determinação da faixa de plantas hospedeiras que podem interagir com o rizóbio está intimamente relacionada às proteínas secretadas por esse sistema. Dependendo da planta, a presença de uma Nop pode melhorar ou bloquear a simbiose, sendo classificado como efetor positivo ou negativo (MARIE et al., 2001). As proteínas secretadas podem ser reconhecidas pelas plantas em diferentes graus e algumas espécies possuem receptores que reconhecem os Nops como fator de virulência, levando a uma resposta de defesa ao invés de um processo simbiótico (KAMBARA et al., 2008; DEAKIN & BROUGHTON, 2009).

O sistema de defesa de plantas é ativado quando microrganismos ou patógenos tentam entrar na célula vegetal e podem ser induzidos em duas etapas, a primeira conhecida por imunidade desencadeada por padrões moleculares (PTI - Pattern-Triggered Immunity) e a segunda conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI - effector triggered immunity) (JONES & DANGL, 2006).

O sistema de defesa ETI (imunidade desencadeada por efetores) reconhece proteínas específicas secretadas pelo sistema de secreção de bactérias patogênicas ou simbióticas. Os efetores podem ser reconhecidos direta ou indiretamente pelas proteínas NB-LRRs (*nucleotide-binding leucine-rich repeats*), que são codificadas pelos genes *R*, uma das maiores famílias de genes das plantas (NOMAN et al., 2019). Assim, para que a nodulação seja bem-sucedida é necessário compreender como os efetores Nops são reconhecidos pela célula vegetal e como eles interagem com o sistema de defesa do hospedeiro. Muitas proteínas hospedeiras envolvidas na identificação de efetores de patógenos, incluindo NB-LRRs, foram bem caracterizadas, no entanto, a interação entre os efetores do rizóbio e as proteínas codificadas pelos genes *R* e as consequências de sua interação são pouco compreendidos (JONES et al., 2006; GOURION et al., 2015).

Phaseolus vulgaris (feijão comum) e *S. fredii* NGR234 podem se associar formando nódulos que fixam nitrogênio. O feijão é uma importante fonte de proteína na alimentação da população brasileira, principalmente para as classes de baixa renda, sendo considerada uma cultura de grande importância econômica (RIOS; ABREU; CORRÊA, 2003; FAO, 2013). Em termos de produção, o Brasil foi considerado em 2015, o terceiro maior produtor mundial, respondendo por 11% da produção mundial.

Existem diversas iniciativas que têm como objetivo o aumento de produtividade desta leguminosa. O nitrogênio é um dos principais nutrientes para o seu desenvolvimento, sendo sua disponibilidade limitante na produção de uma cultura. A adubação nitrogenada em solos além da desvantagem econômica pode causar danos ao meio ambiente (PELEGRIN et al., 2009). Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos, a fixação biológica do nitrogênio pode contribuir com a preservação ambiental, eliminando o impacto negativo causado pelos produtos químicos (STRALIOTTO et al., 2002).

Para implementar o uso de rizóbios em culturas de leguminosas, é necessário conhecer os aspectos moleculares no reconhecimento da planta e das proteínas Nops secretadas pela bactéria. Desta forma, este trabalho analisou o transcriptoma de nódulos e primórdios de nódulos de *P. vulgaris* inoculados com estirpes selvagem de *S. fredii* NGR234 e mutantes *nopJ*-, *nopM*- e *rhcN*- com o objetivo de identificar os genes diferencialmente expressos no feijão envolvidos na resposta aos Nops, como também as vias metabólicas em que eles estão envolvidos.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 Fixação de Nitrogênio

O nitrogênio constitui o nutriente mais importante para o crescimento de plantas em ambiente natural. As principais moléculas que compõem a matéria viva, como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, apresentam nitrogênio em sua composição, além de carbono e hidrogênio. A atmosfera é o principal reservatório de nitrogênio, sob forma de N_2 , embora as plantas e animais não possam utilizá-lo diretamente. Os animais necessitam do nitrogênio incorporado em compostos orgânicos (aminoácidos e proteínas), enquanto plantas e algas necessitam do nitrogênio sob a forma de íons nitrato (NO_3) ou íons amônio (NH_4) (FRANCO & DOBEREINER, 1994). Uma das formas de absorção do N_2 atmosférico pelos seres vivos ocorre pelo processo denominado de fixação biológica de nitrogênio, onde uma molécula de N_2 é convertida a duas moléculas de NH_3 . Esse processo é realizado por bactérias chamadas de diazotróficas (POSTGATE, 1998).

As bactérias fixadoras de nitrogênio são classificadas em três grupos: diazotrofos de vida livre, capazes de fixar o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta a qual se associam, mas não formam estruturas diferenciadas e não estabelecem simbiose; e diazotrofos simbióticos conhecidos como rizóbios, que estabelecem uma interação com a planta infectada e, após ocorrer troca de sinais moleculares entre o vegetal e a bactéria e estes serem compatíveis, formam estruturas diferenciadas denominadas nódulos (EVANS & BURRIS, 1992). As bactérias noduladoras são designadas de rizóbios e são capazes de se associar com a maioria das leguminosas da família Leguminosae, disponibilizando para a planta o nitrogênio fixado, que por sua vez fornece ao simbionte uma fonte de carbono (DILWORTH & GLENN, 1991; DIXON & KAHN, 1994; PATRIARCA et al., 2002).

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

Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos, a fixação biológica do nitrogênio

contribui com a preservação ambiental, eliminando o impacto negativo causado pelos produtos químicos (STRALIOTTO et al., 2002). As bactérias capazes de realizar este processo possuem o complexo enzimático da nitrogenase (POSTGATE, 1998). Este complexo é formado por duas metaloproteínas: a proteína-MoFe (dinitrogenase) e a proteína-Fe (dinitrogenase redutase). Ambas proteínas perdem a atividade rapidamente quando expostas ao ar (DIXON & KAHN, 2004). Além disso, como o funcionamento da nitrogenase consome grande quantidade de energia para reduzir o nitrogênio atmosférico, tanto a síntese quanto a atividade deste complexo enzimático são reguladas.

Em diazotróficos de vida livre como *Azotobacter vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae*, são necessários pelo menos 20 genes *nif* para a síntese da nitrogenase (HU et al., 2007; RUBIO & LUDDEN, 2008). Em rizóbios a maioria destes genes está presente, no entanto, uma análise comparativa dos genomas mostrou que o número de loci conservados de genes *nif* varia consideravelmente nestes organismos (MASSON-BOIVIN et al., 2009). Em *Sinorhizobium fredii* NGR234, por exemplo, são encontrados os genes *nifQ*, *nifW* e *nifZ* que não são estão presentes em *Sinorhizobium meliloti* 1021 (FREIBERG et al., 1997; GALIBERT et al., 2001). Além dos genes *nif*, a fixação simbiótica de nitrogênio envolve vários loci de genes *fix* específicos de rizóbios. Os genes *fixABC* codificam para uma cadeia transportadora que fornece elétrons à nitrogenase (ARIGONI, 1991). Os genes *fixNOQP* codificam a enzima citocromo oxidase que permite que os bacteróides respirem em ambiente com baixa concentração de oxigênio (DELGADO et al., 1998), enquanto os genes *fixGHIS* estão envolvidos na formação de bombas catiônicas indispensáveis para a fixação de nitrogênio nos bacteróides (KAHN et al., 1989). Nos diazotrofos de vida livre e simbióticos, os genes *nif* que codificam componentes do aparato de fixação N₂ estão sob o controle transcricional da proteína NifA (DIXON & KAHN, 2004). NifA pertence à família de ativadores transcricionais que interage com o fator σ^{54} da RNA-polimerase na posição -24/-12 nas regiões promotoras que precedem os genes *nif* e *fix* (GONZALEZ et al., 1998). Embora as etapas regulatórias no controle da fixação de nitrogênio se diferenciem entre os diazotrofos, em geral os organismos regulam a expressão de *nifA* e/ou modulam a atividade de NifA em resposta as condições celulares de oxigênio e/ou nitrogênio (PERRET, 2011).

Para garantir o funcionamento da nitrogenase, os nódulos precisam de um interior anaeróbico ou microaeróbico, uma vez que esta enzima é altamente sensível ao oxigênio (ROBSON & POSTGATE, 1980). As bactérias diazotróficas regulam o suprimento de oxigênio para prover ATP e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase contra seu efeito deletério (REIS et al., 2006). Para tanto, os rizóbios apresentam processos e estruturas que impedem o acúmulo de oxigênio no interior dos nódulos. Nas camadas celulares externas dos nódulos é formada uma barreira de difusão gasosa, que controla a taxa de

influxo de oxigênio para o tecido infectado central. Além disso, a proteína leghemoglobina liga-se ao oxigênio disponível no citoplasma, levando-o aos bacteróides e mitocôndrias vegetais, que por possuírem altas taxas de respiração, o consomem rapidamente diminuindo sua disponibilidade no interior do nódulo (REIS et al., 2006; UDVARDI & POOLE, 2013).

Os nódulos podem ser de dois tipos baseados na atividade do meristema do nódulo: determinados e indeterminados. Os nódulos indeterminados são alongados, bem ramificados, originam-se de células corticais interiores adjacentes à endoderme e são organizados em zonas (desenvolvimento em gradiente), o que facilita a análise funcional dos distintos estágios da simbiose. São 5 diferentes zonas que formam os nódulos indeterminados: I) zona meristemática, onde se encontra o meristema apical; II) zona de invasão, que contém os cordões de infecção que entregam os rizóbios nas células da planta; III) interzona, na qual o rizóbio sofre diferenciação; IV) zona de fixação de nitrogênio; V) zona de senescência, que fica próxima à raiz e onde os rizóbios estão cessando a fixação de nitrogênio em nódulos velhos. O meristema apical desses nódulos produz continuamente novas células, ou seja, a divisão desses nódulos é constante. Já os nódulos determinados, são geralmente redondos, surgem a partir do córtex central e não exibem um gradiente organizado. Esse tipo de nódulo contém células de rizóbios que são semelhantes em tamanho e capacidade reprodutiva parecidas com as bactérias de vida livre, diferente dos nódulos indeterminados que apresentam rizóbios de tamanho maiores (LI et al., 2013; UDVARDI & POOLE, 2013; OLDROYD et al., 2011; KERESZT et al., 2011).

2.2 Nodulação

A denominação rizóbio refere-se ao grupo de microrganismos que engloba os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Estas bactérias são capazes de fixar nitrogênio e estabelecem uma relação simbiótica com a planta infectada quando sinais moleculares trocados entre o vegetal e a bactéria são compatíveis, formando estruturas chamadas nódulos (PATRIARCA; TATE; LACCARINO, 2002; DIXON & KAHN, 1994)

A nodulação começa com uma troca de sinais moleculares específicos entre a planta hospedeira e o rizóbio (EHRHARDT et al., 1996; SPAINK, 2000). Para que ocorra a nodulação é necessário um reconhecimento entre a planta e o rizóbio, que é mediado pelos flavonóides (derivados de 2-fenil-1,4-benzopirona), secretados pelas raízes das plantas, e pelos fatores Nod (Oligossacarídeos lipoquítinicos), secretados pelas bactérias (FREIBERG et al., 1997).

Os flavonóides quando secretados pelas raízes iniciam a comunicação molecular entre os simbiossomas. Na superfície radicular, o rizóbio se prolifera e adere aos pelos radiculares da planta hospedeira. Essa adesão envolve duas etapas, sendo a primeira uma ligação fraca mediada pela proteína ricasina (SMIT et al., 1989) e a segunda uma ligação forte através de fibrilas de celulose (CHUMAKOV, 1996).

A presença dos flavonóides leva à ativação das proteínas bacterianas NodD. Essas proteínas pertencem à família LysR de reguladores transcricionais e formam com os flavonóides um complexo capaz de ligar-se a sítios conservados chamados *nod* boxes, que estão presentes em regiões promotoras dos genes *nod*. Apesar das proteínas NodD ligarem-se naturalmente à *nod* boxes, os genes *nod* correspondentes só serão expressos na presença de flavonóides (FISHER & LONG, 1993).

Os genes *nod* codificam proteínas responsáveis pela síntese de fatores Nod, que são lipo-quito-oligossacarídeos importantes para indução do desenvolvimento dos nódulos. Um controle altamente preciso da transcrição dos genes *nod* pode estar associado a variações nas sequências dos *nod* boxes (FREIBERG et al., 1997).

Os fatores Nod induzem várias respostas na planta, tais como deformação dos pelos radiculares, despolarização das membranas e flutuações nos níveis de cálcio intracelular das raízes, alterações no citoesqueleto das células radiculares, formação do cordão de pré-infecção, multiplicação das células corticais e desenvolvimento do nódulo (BARTSEV et al., 2004).

Inicialmente, a ação dos fatores Nod induz o encurvamento dos pelos radiculares das plantas hospedeiras, gerando um ponto de infecção. O contato do rizóbio com a parede celular do pelo, faz com que este se deforme e haja a degradação da parede celular no local de iniciação do cordão de infecção para que a bactéria entre em contato com o tecido da planta. Apesar dos fatores Nod serem de extrema importância, outros carboidratos e proteínas são necessários para o desenvolvimento do cordão de infecção e subsequentes passos para a formação do nódulo (PERRET et al., 2000).

O cordão de infecção é uma estrutura tubular formada através da invaginação da parede celular e da membrana plasmática. Esse cordão cresce em direção à base das células da epiderme da raiz e para as células subjacentes, e dentro do qual as bactérias se dividem, penetrando a raiz da planta. Ou seja, é através dessa estrutura que as bactérias entram efetivamente na raiz das células hospedeiras e inicia-se a formação de nódulos. Na extremidade do cordão de infecção, as células bacterianas são liberadas no citoplasma vegetal e envolvidas em uma membrana derivada da própria célula vegetal, para formar um simbiossoma (OLDROYD et al., 2005; KAMBARA, 2008). Dentro do citoplasma do hospedeiro as bactérias se multiplicam e se diferenciam em formas fixadoras de nitrogênio, passando a ser denominadas bacteróides. Os bacteróides são envolvidos pela membrana da

planta, que passa por mudanças significativas, para que haja troca de metabólitos e redução do nitrogênio. Tecidos não infectados conectam os elementos de transporte e sistema vascular da raiz com os componentes dos nódulos (UDVARDI & POOLE, 2013; OLDROYD & DOWNIE, 2004).

Além do papel dos fatores de nodulação na simbiose, outras moléculas associadas a parede celular, como lipopolissacarídeos (LPS), ou secretadas pela bactéria, como exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares (antígenos K e KPS) e glucanas cíclicas fazem parte do diálogo molecular com a planta (GIBSON et al., 2008; KAMBARA, 2008).

Os exopolissacarídeos (EPS) têm um papel no estágio inicial da simbiose, no estabelecimento e na extensão do cordão da infecção. Kawaharada *et al.* (2015) observaram que o receptor quinase *epr3*, liga-se diretamente ao exopolissacarídeo (EPS) e controla a infecção rizobial em *Lotus japonicus*. Neste mesmo estudo, foi observado que em presença de receptor quinase mutado não ocorreu fixação de nitrogênio em nódulos de *Leucaena leucocephala* (KAWAHARADA et al, 2015).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais componentes da membrana externa das bactérias Gram-negativas e atuam como moléculas protetoras. Em rizóbios, os LPS também atuam em diferentes estágios da simbiose, como no reconhecimento inicial, na infecção e invasão do tecido radicular, na liberação bacteriana nas células vegetais e na formação de simbiossomas (SKORPIL & BROUGHTON, 2006). Em *S. fredii* NGR234, uma forma de LPS é sintetizada em presença de flavonóides, e apresenta em sua composição resíduos de ramnose. A presença de ramnose em LPS é importante para que ocorra a interação entre NGR234 e espécies de leguminosas (MARIE et al, 2004; ARDISSONE et al., 2011). Ardissonne et al. (2011), observaram que estirpes mutantes de *S. fredii* NGR234 que não sintetizavam LPS rico em ramnose, não foram capazes de nodular *Vigna unguiculata*.

As enzimas responsáveis pela síntese de LPS contendo resíduos de ramnose estão sob o controle de TtsI, um ativador transcricional que liga-se a regiões conservadas chamadas *tts*-boxes (TB) (MARIE et al., 2004; BROUGHTON et al., 2006). TtsI controla vários sinais simbióticos específicos que são necessários para a formação de nódulos depois dos fatores Nod. Em *S. fredii* NGR234, além de controlar modificações na estrutura dos lipopolissacarídeos, TtsI também controla a síntese de T3SS (KAMBARA et al., 2009; WASSEM et al., 2008).

Os polissacarídeos capsulares (KPS) estão fortemente associados à membrana externa dos rizóbios e geralmente desempenham um papel no estágio inicial da simbiose. Em *Sinorhizobium fredii* NGR234, alguns KPS são antígenos específicos, com estruturas análogas aos antígenos K do grupo II encontrados em *Escherichia coli* (REUHS et al.,

1993). Neste organismo, um mutante para os genes responsáveis para a síntese de KPS apresentou capacidade reduzida de iniciar a infecção simbiótica (LE QUÉRÉ et al., 2006).

Outro fator requerido para a formação de nódulos fixadores de nitrogênio e que afeta a nodulação de muitos hospedeiros, são as proteínas externas de nodulação (Nops – *nodulation outer proteins*) (MARIE et al., 2001). Estas proteínas são secretadas por meio de um sistema de secreção do tipo três (T3SS), usada por várias bactérias gram-negativas para exportar proteínas Nops para o meio extracelular. Ao injetar as proteínas, o T3SS altera o funcionamento normal das células eucarióticas (GALAN & COLLMER, 1999). Compreender as funções específicas desses efetores tornou-se uma prioridade para elucidar a interação rizóbio-planta.

2.3 *Sinorhizobium fredii* NGR234

O bacilo gram-negativo *Sinorhizobium fredii* NGR234 (New Guinea Rhizobium 234), ordem Rhizobiales, é capaz de nodular as raízes de mais de 112 gêneros de plantas da família Fabaceae, além de uma não leguminosa *Parasponia andersonii* (PUEPPKE & BROUGHTON, 1999). Devido a sua ampla faixa hospedeira, NGR234 se tornou um organismo modelo para estudos de simbiose. NGR234 possui um genoma de 6,9 Mpb, dividido em três replicons: um plasmídeo simbiótico (pNGR234a) de 0,54 Mpb que apresenta a maioria dos genes relacionados à nodulação e à fixação de nitrogênio; um megaplasmídeo (pNGR234b) de 2,43 Mbp com genes responsáveis pela síntese dos polissacarídeos de superfície; e um cromossomo de 3,93 Mbp (cNGR234), que codifica a maioria das proteínas com funções essenciais para o crescimento celular (FREIBERG et al., 1997; SCHMEISSER et al. 2009). Análises comparativas indicam que NGR234 pode ter incorporado grande parte do conteúdo do pNGR234b de outros microrganismos do solo que se associam a plantas (STREIT et al., 2004). O plasmídeo simbiótico pNGR234a deste microssimbionte contém os genes essenciais para a nodulação.

A promiscuidade dessa estirpe pode ser parcialmente explicada pelos fatores simbióticos específicos que ela produz. A formação de nódulos requer diferentes tipos de sinais da bactéria, que desempenham papéis importantes em várias fases da simbiose. NGR234 é capaz de sintetizar uma variedade de fatores Nod (com pelo menos 80 estruturas diferentes) que são responsáveis por iniciar a entrada dos rizóbios na planta no início do processo de nodulação; secretam diversas proteínas por meio de um sistema de secreção de tipo III, sendo a provável causa da ampla gama de hospedeiros; e produzem lipopolissacarídeos ricos em ramnose que contribuem para diversas fases do desenvolvimento simbiótico (BROUGHTON et al., 2000; FRAYSSE, et al., 2002; PERRET

et al., 2000; VIPREY, et al., 1998; MARIE, et al., 2004). Todos esses fatores em conjunto determinam o grau de eficiência da nodulação (Figura 1).

Em rizóbios, para ser iniciada a nodulação, as proteínas NodD ligam-se aos flavonóides que foram secretados pela raiz da planta. Este complexo liga-se a sequências de DNA altamente conservadas chamadas de *nod*-boxes (NB), encontrados nas regiões promotoras da maioria dos genes *nod* (FISHER & LONG, 1993). Em NGR234 existem dois genes *nodD* que codificam para as proteínas NodD1 e NodD2. A proteína NodD1 se liga às regiões NB ativando a síntese de fatores Nod e a proteína NodD2 atua como repressor da expressão de genes *nod*. No plasmídeo simbiótico pNGR234a, existem 19 elementos *nod-box* bem conservados e entre esses, 18 são induzidos por NodD1, de maneira dependente de flavonóides (FREIBERG et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2004). Além disso, *nod*-boxes apresentam uma hierarquia temporal nos padrões de indução dos diferentes promotores (KOBAYASHI et al., 2004).

Nas bactérias noduladoras, os genes *nodABC* são necessários para sintetizar a estrutura básica dos fatores Nod, uma família de lipo-quito-oligossacarídeos (PERRET et al., 2000). Alterações nesta estrutura básica também ocorrem para desempenhar papéis mais sutis na nodulação, alterando a especificidade do hospedeiro ou protegendo fatores Nod da degradação. Ou seja, diferentes espécies de rizóbios possuem genes *nod* específicos, o que permite que produzam um conjunto de fatores Nod com substituintes específicos, como por exemplo, adição de ácidos graxos à estrutura padrão, adição de fucose, grupos sulfatos, acetil, 2-O-metil, N-metil, entre outros (OLDROYD & DOWNIE, 2004). Ao liberarem os fatores Nod, e estes serem detectados pelas plantas através de um receptor de alta afinidade, mudanças no desenvolvimento da planta ocorrem permitindo a entrada do rizóbio no hospedeiro.

Em *S. fredii* NGR234, a cascata regulatória da nodulação envolve as proteínas NodD1, NodD2, SyrM1, SyrM2 e TtsI (KOBAYASHI et al., 2004; WASSEM et al., 2008). Os flavonóides compatíveis interagem com a proteína NodD1 e desencadeiam uma cascata reguladora que leva à ativação de pelo menos 75 loci no pNGR234a. Inicialmente, NodD1 ativa a transcrição dos operons responsáveis pela síntese dos fatores Nod, permitindo que o início da interação de NGR234 com o hospedeiro. NodD1 também ativa a síntese de TtsI e SyrM2 via NB18 e NB19, respectivamente. Isso aciona funções adicionais que são necessárias quando ocorre um contato mais íntimo entre a bactéria e seu hospedeiro. Por sua vez, a proteína SyrM2 ativa a transcrição de *nodD2*. No terceiro nível regulatório, a proteína NodD2 aciona promotores induzíveis tardiamente por flavonóides, como *fixF* (controlado por NB6), que está envolvido na síntese de um LPS rico em ramnose. Concomitantemente, a proteína NodD2 também reprime a expressão de *nodD1*. Enquanto

isso, a proteína TtsI ativa a síntese de outros LPS ricos em ramnose, bem como os genes envolvidos na estrutura e funcionamento de T3SS.

Como descrito na cascata acima, a proteína NodD1 também está envolvida na ativação da síntese de TtsI. NodD1 liga-se a regiões *nod*-boxes a montante do gene *ttsI*, ativando a síntese da proteína TtsI, um ativador transcricional dos genes que codificam para o sistema de secreção do tipo III (T3SS) e que codificam para lipopolissacarídeos que compõem a parede bacteriana. As regiões conservadas nas regiões promotoras dos genes que codificam para proteínas que irão compor o T3SS, são chamadas *tts*-boxes ou TB (MARIE et al., 2004; WASSEM et al., 2008). Em NGR234, a análise de sequências revelou a presença de 11 regiões TB no pNGR234a (MARIE et al., 2004). A maioria dos TBs foram encontrados a montante de genes que codificam proteínas que compõem o T3SS ou que são secretadas por este sistema. Além disso, duas regiões TB estão localizadas em um cluster de genes envolvidos na síntese de ramnose (BROUGHTON et al., 2006; MARIE et al., 2004; REUHS et al., 2005). Assim, o ativador transcricional TtsI regula não apenas o T3SS, mas também outros fatores de simbiose. Ensaio transcricional mostraram que TtsI pode se ligar a promotores contendo TB *in vitro* e que a expressão de 10 dos 11 TB são dependentes de flavonóides e TtsI (WASSEM et al., 2008).

O sistema de secreção do tipo III de *S. fredii* NGR234 secreta proteínas externas de nodulação, Nops (*nodulation outer proteins*), que interferem na eficiência da nodulação de alguns hospedeiros. As funções destas proteínas ainda não é bem compreendida, mas o seu reconhecimento parece envolver vias de defesa da planta. Em uma planta hospedeira compatível, as proteínas efetoras do T3SS apresentam uma atividade de avirulência, bloqueando o sistema imune da planta. A determinação da faixa hospedeira que pode interagir com o rizóbio está intimamente relacionada às proteínas secretadas por esse sistema. Dependendo da planta, a inibição de um Nop pode melhorar ou bloquear a simbiose (MARIE et al., 2001).

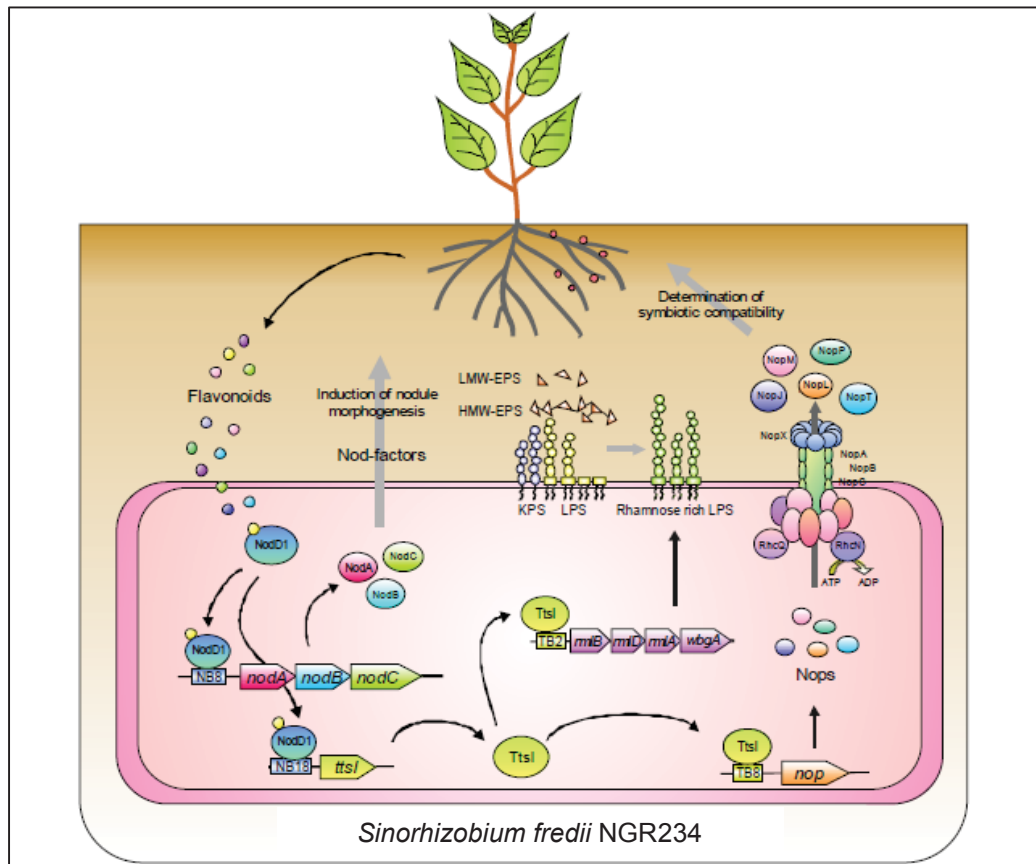


FIGURA 1. Modelo de interação entre leguminosas e NGR234. Flavonóides secretados pelas raízes das leguminosas induzem a expressão de genes simbióticos na bactéria e a síntese de sinalizadores moleculares bacterianos, como fatores Nod via NodD1, polissacarídeos de superfície e efetores Nop. Fonte: Kambara, 2008.

2.4 Sistema De Secreção Tipo III (T3SS)

Muitas bactérias gram-negativas apresentam o sistema de secreção tipo III (T3SS) que permite a colonização das células do seu hospedeiro. O sistema de secreção injeta proteínas efetoras (Nops) diretamente no citoplasma da célula eucariótica e assim permite modificar as atividades da célula hospedeira para o seu benefício (DEAKEN & BROUGHTON, 2009).

O transporte das proteínas efetoras (Nops) da célula bacteriana gram-negativa para o citoplasma da célula eucariótica requer a passagem das proteínas através de barreiras físicas: duas membranas bacterianas separadas por uma camada peptidoglicana e a membrana plasmática da célula da planta. A injeção das proteínas efetoras é possível devido a formação de uma estrutura denominada pilus (Figura 2), que atua como um canal contínuo entre as células para que ocorra a secreção proteica (HE et al., 2004; KAMBARA et al., 2009).

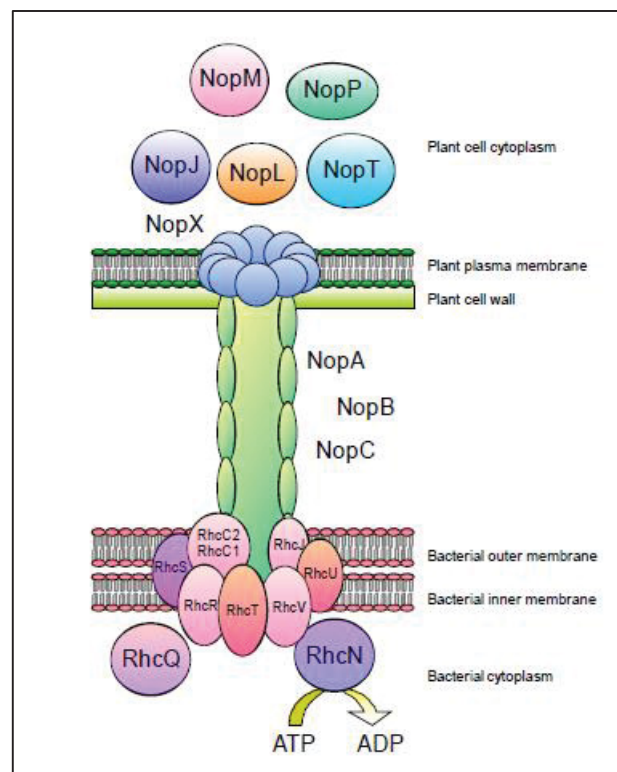


FIGURA 2. Modelo proposto do Sistema de Secreção Tipo III em NGR234, adaptado de Viprey et al., (Viprey et al., 1998).

Fonte: Kambara, 2008.

O sistema T3SS foi inicialmente descrito em bactérias patogênicas, e mais tarde esse sistema foi identificado em rizóbios, tais como: *S. fredii* NGR234 (FREIBERG et al., 1997), *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (KANEKO et al., 2000), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (GÖTTFERT et al., 2001), *S. fredii* USDA257 (MEINHARDT et al., 1993), USDA191 (BELLATO et al., 1997) e HH103 (BELLATO et al., 1997; MARIE et al., 2001).

Em bactérias patogênicas de plantas, o sistema de secreção tipo III é codificado por pelo menos 9 genes *hrp*, que estão presentes também em bactérias patogênicas de animais. As proteínas codificadas por esses genes constituem os componentes do núcleo da maquinaria do sistema de secreção tipo III (HUECK, 1998). Quando ocorre a secreção das proteínas efetoras oriundas das bactérias patogênicas, é iniciada a resposta hipersensitiva (HR) ou reação de hipersensibilidade nas plantas. Esta forma de resposta é caracterizada por ser uma ação rápida e localizada, que ocorre no sítio de infecção do patógeno (FERNANDES et al., 2009). Ocorre um colapso rápido e localizado do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2004).

Nos rizóbios, o sistema de secreção tipo III transporta uma ampla variedade de proteínas para o meio extracelular levando ao processo de 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 do sistema de secreção podem ser cromossomais ou estarem em plasmídeos (MARIE et al., 2001).

Em *Sinorhizobium fredii* NGR234, o sistema de secreção tipo III foi identificado no plasmídeo simbiótico pNGR234a após sequenciamento completo (FREIBERG et al., 1997; SCHMEISSER et al., 2009). A sequência conservada do sistema de secreção tipo III de rizóbios contém 10 ORFs, que são homólogas aos genes *ysc* e *hrc* encontrados em bactérias patogênicas. 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). Em NGR234, ao menos 20 genes estão envolvidos na ativação do T3SS, incluindo os que codificam para as proteínas Nops. O gene *rhcN* codifica a proteína RhcN (componente conservado do T3SS) e possui características de ATPase sendo responsável por fornecer energia ao aparato de secreção tipo III, que injeta as proteínas efetoras (Nops) no citoplasma da célula vegetal (VIPREY et al., 1998). As proteínas NopA, NopB, NopC e NopX são constituintes do pilus, enquanto NopM, NopJ, NopL, NopT e NopP são efetores translocados para a planta (VIPREY et al., 1998; MARIE et al., 2003; AUSMEES et al., 2004; DEAKIN et al., 2005; SAAD et al., 2005; STAEHELIN & KRISHNAN, 2015).

Em *B. japonicum*, genes homólogos ao *nopA*, *nopB*, *nopL* e *nopP* de *S. fredii* NGR234 foram encontrados no grupo de genes regulados por TtsI. Entretanto, um gene homólogo ao *nopX* de NGR234 está ausente no genoma de *B. japonicum* (KRAUSE et al., 2002). *S. fredii* USDA257 e HH103 possuem um sistema T3SS muito similar ao de NGR234, secretando Nops. Em USDA257 foram descritos Nops (NopX, NopB, Nop38 e Nop7) associados com o pili (KRISHNAN, 2002; KRISHNAN et al., 2003; LORIO et al., 2004). Em HH103, NopA, NopC, NopL, NopP e NopX foram confirmados como sendo proteínas secretadas pelo T3SS (Rodrigues et al., 2007), além do NopM e NopD que são homólogos ao NopM de NGR234 e XopD de *X. campestris pv. vesicatoria*, respectivamente (HOTSON et al., 2003).

2.5 Funções das Proteínas Secretadas pelo T3SS

O sistema de secreção tipo III (T3SS) transloca proteínas efetoras (Nops) para o interior da célula vegetal onde podem desencadear diferentes respostas. As proteínas secretadas podem ser reconhecidas pela planta hospedeira e auxiliar no estabelecimento da simbiose. Por outro lado, algumas espécies de planta podem reconhecer os Nops como fatores de virulência, provocando respostas de defesa ao invés de processos simbióticos (GOURION et al., 2015).

Em *S. fredii* NGR234, um T3SS funcional é requerido para uma nodulação eficiente em algumas espécies de plantas, como em *Tephrosia vogelii* e *Lablab purpureus* mas não é necessário para *Leucaena leucocephala* and *Vigna unguiculata* (VIPREY et al. 1998; MARIE et al., 2003; AUSMEES et al., 2004). Entretanto, para outros hospedeiros como *Pachyrhizus tuberosus*, *Crotalaria juncea* e *Phaseolus vulgaris* BAT93, os efetores do T3SS podem diminuir ou impedir o desenvolvimento de nódulos (VIPREY et al. 1998; MARIE et al., 2003, LARIGUET, dados não publicados).

Plantas de espécies diferentes manifestam fenótipos diferentes quando inoculadas com mutante *rhcN*-. Comparando seu efeito com o da estirpe selvagem NGR234, o mutante proporciona um grande aumento na nodulação em *P. tuberosus* e o oposto ocorre em *T. vogelii* (VIPREY et al., 1998). A maior variação fenotípica após a inoculação com diferentes estirpes de *S. fredii* NGR234 foi observada em *Crotalaria juncea*. A estirpe selvagem induz a formação de nódulos ineficientes, enquanto os mutantes *nopP*- e *nopM*- 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).

Os efeitos de cada Nop de NGR234 na eficiência da nodulação também variam amplamente dependendo do hospedeiro. NopL age como efetor positivo na nodulação de *T. vogelii* e *L. purpureus*, no entanto é negativo para *P. vulgaris* BAT193 (MARIE et al., 2003; LARIGUET, dados não publicados). NopP foi identificado como efetor positivo para vários legumes, incluindo *P. vulgaris* BAT93, porém apresentou efeito negativo para *V. unguiculata* (AUSMEES et al., 2004; SKORPIL et al., 2005; KAMBARA et al., 2009; LARIGUET, dados não publicados). NopT é positivo para *T. vogelii* e negativo para *C. juncea* (DAI et al., 2008; KAMBARA et al., 2009). NopJ foi identificado como efetor negativo na nodulação de *L. purpureus* e *P. vulgaris* BAT93 (KAMBARA et al., 2009; LARIGUET, dados não publicados) enquanto NopM foi positivo para *L. purpureus* (KAMBARA et al., 2009). Em alguns casos os efetores não apresentaram efeito sobre a nodulação, como observado com NopL para *C. juncea*, NopT para *P. tuberosus* e NopM para *P. vulgaris* BAT93 (MARIE et al., 2003; KAMBARA et al., 2009; LARIGUET, dados não publicados).

Comparados aos efetores do sistema T3SS de bactérias patogênicas, pouco é conhecido sobre a função dos efetores de rizóbios e seus alvos e/ou receptores na planta hospedeira ainda não foram identificados.

O efector NopM de *S. fredii* NGR234 apresenta homologia com a proteína YopM do patógeno *Yersinia* sp. Xin e colaboradores (2012) observaram que NopM possui um domínio funcional NEL (Novel E3 Ubiquitin Ligase) e estudos com tabaco sugerem que a atividade de ubiquitinação de NopM está envolvida na indução de respostas de imunidade (XU et al., 2018). Além disso, NopM pode ser fosforilado por MAPKs do hospedeiro, provavelmente MAPKs, mas não se sabe como isto pode afetar sua atividade (XU et al., 2018). O efector NopT pertence à família de proteases YopT, que inclui AvrPhbB do patógeno *Pseudomonas syringae* (pv. phaseolicola) (STAEHELIN & KRISHNAN, 2015). NopT tem atividade autoproteolítica que expõe o resíduo G50, o qual é alvo de miristoilação em células eucarióticas. Esta alteração resulta no direcionamento de NopT para membrana plasmática da célula (DAI et al., 2008).

Os efetores NopL e NopP não tem homólogos nas bactérias patogênicas (STAEHELIN & KRISHNAN, 2015). A proteína NopL é um substrato de MAPK e pode ser fosforilada em múltiplos sítios (BARTSEV et al. 2003; ZHANG et al., 2011; GE et al., 2016). Zhang et al., (2011) observaram que nódulos de *P. vulgaris* (cv. Tendergreen) inoculados com um mutante *nopL*- de NGR234 mostraram uma alta frequência de lesões necróticas, quando comparado com nódulos obtidos com a estirpe selvagem. Estes resultados sugerem que NopL pode estar envolvido no processo de senescência dos nódulos.

O efector NopP de NGR234 também pode ser fosforilado *in vitro* por quinases de plantas e o sítio de fosforilação está localizado na região N-terminal (SKORPIL et al., 2005). Este efector geralmente tem efeito positivo na nodulação, porém NopP de *S. fredii* HH103 apresentou efeito negativo na simbiose com soja (cv. Williams). LÓPEZ-BAENA et al., (2009) observaram que a expressão do gene *PR1* (*pathogenesis related*), foi diminuída quando a soja foi inoculada com um mutante *nopP*, sugerindo envolvimento deste efector com o sistema de defesa da planta.

A proteína efectora NopJ de NGR234 tem efeito negativo na nodulação de *P. vulgaris*. Homólogos desta proteína são encontrados em várias bactérias patogênicas tanto de plantas como de animais (KAMBARA et al., 2009). A comparação entre as sequências destes homólogos sugere que NopJ pode atuar como uma acetiltransferase ou uma protease (Lariguet, dados não publicados).

Em NGR234, um mutante duplo NGR Ω *nopL* Δ *nopP* apresentou um fenótipo mais pronunciado que os simples mutantes, sugerindo que os Nops podem atuar de forma conjunta (SKORPIL et al., 2005). Em *L. purpureus*, a nodulação de um mutante duplo

NGR Δ nopM Δ nopP foi menor que o simples mutante NGR Δ nopM e o selvagem NGR234. Este resultado mostrou o efeito positivo de NopM e NopP na nodulação em *L. purpureus* (KAMBARA et al., 2009). Além disso, o duplo mutante NGR Ω nopM Δ nopT mostrou uma capacidade de nodulação menor em comparação com o tipo selvagem NGR234, indicando o efeito positivo dos NopM e NopT na nodulação de *L. purpureus* (KAMBARA et al., 2009). Também foram estudados o efeito dos Nops na nodulação de *Crotalaria juncea* com mutantes duplos NGR Ω nopJ Δ nopT, NGR Ω nopL Δ nopT, NGR Ω nopM Δ nopT e NGR Ω nopP Δ nopT, e os resultados sugerem um efeito negativo dos NopJ, NopT, NopP e NopM (KAMBARA et al., 2009).

2.6 *Phaseolus vulgaris*

O feijão comum é uma planta herbácea, pertencente à família Fabaceae, que compreende as leguminosas, subfamília Faboideae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris*.

Está entre as principais culturas alimentares, possuindo um dos mais altos níveis de variação no hábito de crescimento, características das sementes (tamanho, forma, cor), maturidade e adaptação (FAO, 1999). Além disso, é considerada uma fonte proteica vegetal e de aminoácidos essenciais importante, representando de 20% a 28% das proteínas ingeridas pela população (VELAZQUEZ, 1988).

Essa leguminosa participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América latina e África, sendo um dos grãos mais consumidos no Brasil, principalmente como cultura de subsistência em pequenas propriedades, muito embora também seja cultivada com o emprego de tecnologias avançadas (EMBRAPA FEIJÃO, 2014). No Brasil, a produção na safra 2015/2016 foi de 3,18 milhões de toneladas de feijão (CONAB, 2016). O Paraná é considerado o maior produtor da cultura no país, e como ocorre em vários outros estados, o feijoeiro é cultivado principalmente por pequenos e médios produtores (SALVADOR, 2010)

A produção de feijão está muito relacionada aos fatores climáticos, sendo a temperatura o que mais afeta seu desenvolvimento, por participar do florescimento e frutificação do feijoeiro (YAMAGUIISHI, 2008). Além dos fatores climáticos, o cultivo do feijão sofre com a deficiência de nutrientes e pestes, que hoje são combatidos com uso indiscriminado de fertilizantes e pesticidas (FOLEY et al., 2011; CASTRO-GUERRERO et al., 2016). Como essa leguminosa consegue estabelecer associação simbiótica com

rizóbios, entender como esta interação ocorre pode afetar economicamente a agricultura, já que pode levar a uma drástica diminuição do uso de fertilizantes sintéticos.

Além da importância para agricultura, o feijão também é importante nas áreas de saúde e nutrição. Estudos mostraram que a porção não digerível do feijão comum apresenta propriedades que levam à uma diminuição do risco de câncer de cólon além de diminuir sua agressividade (THOMPSON et al., 2012; CAMPOS-VEGA et al., 2013). Além disso, pesquisadores tem desenvolvido variedades de feijão comum com alta concentração de ferro, ajudando a combater sua deficiência em países subdesenvolvidos (BLAIR et al., 2013; PETRY et al., 2015).

O feijão é originário do continente americano e foi domesticado separadamente em dois centros distintos de diversidade genética, de modo que os alelos estão distribuídos em dois grupos: o mesoamericano, ou grupo do norte (do México à região norte da América do Sul - México, América Central, Colômbia, norte do Peru) e o andino, ou grupo do sul (do sul do Peru ao norte da Argentina – Equador, Bolívia, Peru, Argentina) (GEPTS & DEBOUCK, 1991; CHACON et al., 2005).

O genoma nuclear do feijão é composto por 11 pares de cromossomos ($2n=22$) e tem aproximadamente 500Mb, com variações entre diferentes cultivares sequenciados (LOBATON et al., 2018). Apresenta grande quantidade de elementos repetitivos classificados como retrotransposons LTR (regiões terminais longas) que se distribuem em 165 famílias, sendo 65 da família Ty1-copia, 78 da família Ty3-gypsy e 22 não classificados. A maior parte dos retrotransposons LTR integraram-se ao genoma de *P. vulgaris* há 2 milhões de anos, resultado similar ao encontrado em soja (*Glycine max*). Estes resultados sugerem que os elementos repetitivos sofreram eventos de amplificação em ambas as leguminosas. Além disso, o genoma de *P. vulgaris* apresenta centenas de genes potencialmente envolvidos em processos de defesa (BROUGHTON et al., 2003; SCHMUTZ et al., 2014; VLASOVA et al., 2016; LOBATON et al., 2018).

2.7 Sistema de Defesa em Plantas

As plantas desenvolveram estratégias de defesa que são ativadas de forma rápida ao reconhecer um patógeno, evitando assim a progressão da infecção (MATILLA, 2018). As respostas de defesa são energeticamente caras e frequentemente danificam as plantas e os patógenos (BOLTON, 2009).

De forma geral, as plantas apresentam duas estratégias de defesa, um sistema de defesa pré-formado e um sistema de defesa induzível, que permitem que elas resistam à maioria dos patógenos vegetais, um fenômeno que é chamado de resistência não

hospedeira. O sistema de defesa induzível possui duas etapas, a primeira resposta é conhecida como imunidade desencadeada por padrões moleculares (PTI - *Pattern-Triggered Immunity*) e a segunda é conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI - *Effector Triggered Immunity*) (JONES & DANGL, 2006).

O sistema de defesa PTI é uma resposta imune mais fraca se comparada ao ETI, promovendo imunidade local e sistêmica. O PTI pode ser desencadeado quando moléculas de patógenos, microrganismos ou danos causados ao tecido vegetal são reconhecidos pela planta, sendo chamados então de padrão molecular associado à patógeno (PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*), padrão molecular associado a microrganismo (MAMP- *Microbial Associated Molecular Pattern*) e padrão molecular associado ao dano (DAMP – *Damage Associated Molecular Pattern*), respectivamente (NOMAN et al., 2019). Este sistema de defesa é a primeira tentativa da planta para evitar a entrada do patógeno ou microrganismo no tecido vegetal.

As moléculas conservadas de microrganismos (MAMP) como flagelo bacteriano, lipopolissacarídeos de parede celular, quitina e peptidoglicanos, são reconhecidas por receptores de reconhecimento presentes na membrana celular da planta, os PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (NOMAN et al., 2019). Estes receptores podem ser classificados como receptores quinases localizados na membrana plasmática (RLK- *receptor-like kinase*) ou como proteínas do tipo receptor com domínio extracelular (RLP- *receptor-like protein*) que se ligam às moléculas conservadas do microrganismo (BOHM et al., 2014; MACHO & ZIPFEL, 2014). O reconhecimento de MAMPs/PAMPs acarreta diversos eventos de sinalização na planta, como a geração de sinais Ca^{+2} , síntese de hormônios, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), deposição de calosidades contra a parede celular, indução transcricional de genes de defesa e a ativação de cascatas de fosforilação (NEWMAN et al., 2013; ZIPFEL, 2014).

Proteínas flagelinas de bactérias são um exemplo bem conhecido de MAMP. Em *Arabidopsis*, o receptor PRR FLS2 reconhece um segmento de 22 aminoácidos na porção N terminal da proteína flagelina de bactérias Gram-negativas, induzindo diferentes respostas de defesa (ZIPFEL et al., 2004). Também nesta planta, o receptor PRR EFR reconhece um segmento conservado de 18 aminoácidos na porção N terminal do fator de alongação bacteriano Tu (elf18) (ZIPFEL et al, 2006).

Durante a interação rizóbio-leguminosa é observada a supressão do sistema de defesa, o que permite a nodulação e fixação de nitrogênio. A expressão do receptor para flagelina (FLS2) é drasticamente reduzida nos nódulos de *L. japonicus* (LOPEZ-GOMEZ et al., 2012), sugerindo uma adaptação para reduzir a indução de defesa durante a nodulação. Além disso, em um estudo *in vitro*, ao inocular a proteína flagelina purificada de *Mesorhizobium loti* nas raízes de *L. japonicus* foi observado a não fosforilação de MAPKs

do sistema de defesa nas células do vegetal (LOPEZ-GOMEZ et al., 2012). Já em *S. meliloti*, o gene homólogo para a proteína flagelina (*flg22*) apresenta modificações que a tornam inativa como efetor, impedindo a ativação do sistema imune em plantas (FELIX et al., 1999).

Os polissacarídeos de superfície de rizóbios (EPS, LPS e glucanas cíclicas), que estão envolvidos na formação do tubo de infecção e desenvolvimento do nódulo, também desempenham um papel na supressão das respostas de defesa do hospedeiro, um recurso que é compartilhado por bactérias patogênicas e simbióticas (SOTO et al., 2009). Estas moléculas podem induzir uma variedade de respostas na planta hospedeira como despolarização da membrana plasmática, alterações no citoesqueleto, deformação da raiz e indução ou repressão da expressão gênica (D'HAENZE & HOLSTERS, 2002; OLDROYD & DOWNIE, 2008).

Quando a primeira etapa de defesa é superada por patógenos, a resistência da planta inicia uma segunda etapa, conhecida como imunidade desencadeada por efetores (ETI). Os efetores são proteínas secretadas pelos sistemas de secreção tipo III, IV e VI presente em bactérias simbiotes e patogênicas. Ao serem reconhecidas no citoplasma vegetal, acarretam modificações que podem ativar ou não o sistema de defesa. A ETI está associada a uma resposta de defesa mais forte conhecida como resposta hipersensível, levando muitas vezes à morte celular tanto da planta quanto do patógeno/bactéria (MUR et al, 2008, COLL et al, 2011).

Dentro do citoplasma vegetal ocorre o reconhecimento dos efetores do microrganismo pelas proteínas NB-LRRs (*Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeats*), que são codificadas pelos genes *R*, e apresentam domínio com repetições ricas em leucina (BONARDI et al., 2011).

O efetor AvrRpm1 em *Arabidopsis* e o efetor AvrB em soja são reconhecidos pela mesma proteína NB-LRR, denominada RPM1, quando estes são secretados pelo T3SS de *Pseudomonas syringae* (JONES & DANGL, 2006). Já o efetor AvrRpt2, também secretado por *P. syringae*, pode ser reconhecido pela proteína RPS2, outra proteína NB-LRR (JONES & DANGL, 2006).

Algumas proteínas NB-LRR reconhecem indiretamente os efetores secretados pelo sistema de secreção tipo III. Em tomate, para ocorrer o reconhecimento dos efetores AvrPto e AvrPtoB secretados por *P. syringae*, é necessária a interação das proteínas Pto e NB-LRR Prf. Pto liga-se ao domínio N-terminal de NB-LRR Prf, formando um complexo proteico capaz de reconhecer os efetores no citoplasma (MUCYN et al., 2006).

Ao comparar os genomas de *P. vulgaris*, *G. max* e *Arabidopsis*, foram identificados conjuntos de genes associados à resistência que codificam proteínas NB-LRR (NL) (CHEN et al., 2010). Estes genes de resistência estão fisicamente organizados em um grupo

complexo, geralmente localizado na região final do cromossomo. Em feijão, os genes de resistência localizam-se na região terminal dos cromossomos Pv04, Pv10 e Pv11, contendo mais de 40 genes que codificam proteínas NB- LRR enriquecidas com domínios CNL (Pv04 e Pv11) e TNL (Pv10) (GEFFROY et al., 2000). Schmutz et al. (2014), identificaram 376 genes de resistência no genoma do feijão, dos quais 106 codificam proteínas com domínio N-terminal / receptor interleucina-1 (TNL) e 108 codificam proteínas com domínio N-terminal tipo alfa hélice (CNL).

Como já mencionado anteriormente, as bactérias simbióticas utilizam o T3SS para secretar proteínas efetoras nas células vegetais (Nops), e estas proteínas podem ativar ou inativar os sistemas de defesa da planta (MARIE et al., 2003; DEAKIN & BROUGHTON, 2009; GOURION et al., 2015). Assim, o reconhecimento específico entre os efetores bacterianos e a planta hospedeira interfere na eficiência da nodulação.

S. fredii NGR234 é capaz de secretar cinco efetores através do sistema de secreção tipo III, NopM, NopL, NopP, NopJ e NopT em células vegetais hospedeiras, que podem atuar como gatilhos levando à indução da resposta do hospedeiro (SKORPIL et al., 2005; DAI et al., 2008; XIN et al., 2012; GE et al., 2016). A identificação dos genes da planta envolvidos na resposta aos Nops, assim como as vias metabólicas em que eles estão envolvidos, deve contribuir no entendimento dos aspectos moleculares do reconhecimento planta-bactéria.

3. JUSTIFICATIVA

Bactérias fixadoras de nitrogênio são de grande interesse econômico e ambiental pelo seu potencial uso como biofertilizantes. Estas bactérias podem ser utilizadas em associação com diversas culturas com o objetivo de diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados, que além de apresentar um alto custo, podem causar danos ao ambiente por provocar o acúmulo de compostos nitrogenados insolúveis no meio. No entanto, desde o isolamento de uma bactéria até o seu emprego como promotor de crescimento vegetal, várias etapas precisam ser cumpridas. Diversos estudos são necessários para o conhecimento da genética e fisiologia do microrganismo, seu potencial como fixador de nitrogênio e/ou produtor de fitormônios e sua capacidade de interação com diferentes hospedeiros.

Os rizóbios são um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio que induzem a formação de nódulos na planta associada. A cascata de nodulação envolve várias etapas de reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira, incluindo flavonoides, fatores Nod e polissacarídeos. A forma como o hospedeiro reage às proteínas Nops, que são produzidas pela bactéria e transportadas para a planta através do sistema de secreção T3SS, é um fator determinante para o sucesso da nodulação. Entre os grupos dos rizóbios fixadores de nitrogênio, *Sinorhizobium fredii* NGR234 destaca-se pela capacidade de nodular um grande número de espécies. Esta bactéria produz cinco proteínas Nops que podem ser transportadas para a planta. Mutações nos genes *nop* que codificam para estas proteínas ou para componentes do sistema de secreção induzem diferentes respostas em diferentes hospedeiros.

As funções dos efetores Nop de rizóbios na célula vegetal ainda são pouco conhecidas. Além disso, as proteínas da planta responsáveis pelo reconhecimento destes efetores ainda não foram identificadas. A análise do transcriptoma de hospedeiros quando inoculados com rizóbios que podem ou não translocar estes Nops, pode elucidar quais vias da planta estão envolvidas no reconhecimento destes efetores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo identificar os genes de *P. vulgaris* envolvidos no reconhecimento e resposta às proteínas Nops produzidas por *Sinorhizobium fredii* NGR234. A estratégia principal foi a identificação de genes diferencialmente expressos após a inoculação de *P. vulgaris* com as estirpes de NGR234 selvagem e mutantes *nopM*, *nopJ*- e *rhcN*-.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir dos dados de sequenciamento obtidos, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Obtenção de mapeamento das leituras (reads) geradas a partir do sequenciamento de bibliotecas de cDNA utilizando a sequência genômica de *Phaseolus vulgaris*;
- Análise estatística dos dados obtidos e determinação dos genes diferencialmente expressos;
- Análise de vias metabólicas envolvidas na resposta diferencial de *P. vulgaris* às estirpes selvagem e mutantes de *S. fredii* NGR234;
- Validação dos dados de RNA-Seq por qRT-PCR (PCR quantitativa).

5. ARTIGO

Nop effectors of *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 induce defence genes in *Phaseolus vulgaris*

ABSTRACT

Mutual recognition between legumes and rhizobia relies on a multi-step nodulation cascade that starts with plant-excreted flavonoids and lipo-oligosaccharidic Nod-factors that emanate from compatible bacteria. Whether bacteria entry continues and leads to nitrogen-fixing nodules also depends on the host's reaction to Nop effectors - proteins translocated from rhizobia to plant roots via various bacterial secretion systems. *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 is able to nodulate more plants than any other known rhizobia and excretes five Nops - NopJ, NopL, NopM, NopP and NopT via a bacterial type-three secretion system (TTSS). Each Nop affects various plants in different ways. When inoculated onto *Phaseolus vulgaris* (the common bean) for example, the NGR234 T3SS system has a negative effect on nodulation. Exactly which Nop (or Nops) inhibits nodulation of beans is, however, not known. Here we investigated the role of NopJ and the regulatory ATP-synthase coded by *rhcN* on the initiation of nodule primordia of beans. Transcriptome profiles of each treatment were analysed in pairwise comparisons to identify differentially expressed genes (DEGs) in beans. DEGs (total 1,860) were almost equally distributed between primordia- (933) and nodule-samples (927). Amongst the processes known to be regulated by these genes include those involved in plant defence, stress responses, hormone synthesis, plant development and transport of various compounds. Many genes characteristically involved in plant defence including pathogenesis-related (PR) proteins were upregulated by the wild-type NGR234 as compared to *rhcN* mutant that is not able to translocate Nops to plants. We also showed that NopJ triggers plant defence-like reactions in beans.

INTRODUCTION

Symbioses between plants of the family Leguminosae and rhizobia often result in nitrogen-fixing nodules. Nodulation, in which rhizobia become encapsulated in cortical cells of the root, culminates in a structure (the nodule) that allows atmospheric nitrogen to be reduced to ammonia (POOLE et al 2018). Nodule development depends on a complex molecular interplay between plants and rhizobia. Flavonoids constitutively secreted by roots are the initial trigger that de-clenches the synthesis of bacterial Nod-factors that permit rhizobia to enter root-hairs and to migrate towards the cortex in tubular structures called infection-threads. Further development involving proliferation of cortical cells containing bacteria enveloped in outgrowths of infection threads requires other bacterial elements including various polysaccharides and Nops (Nodulation outer proteins) (LÓPEZ-BAENA et al., 2016). Nops are effectors translocated into the cytoplasm of the plant through the Type III Secretion System (T3SS). T3SS are derived from flagella and are highly conserved among pathogenic bacteria, where they were first described and widely studied (DEAKIN AND BROUGHTON, 2009).

The type-three secretion apparatus is a needle-like structure that extends from the bacterial cytoplasm through the inner- and outer-membranes where it can penetrate the host cytoplasm (DIEPOLD AND WAGNER, 2014). To varying degrees, plants recognise injected proteins - some species have receptors that perceive Nops as virulence factors, triggering defence responses while Nop receptors of compatible hosts bind certain Nops to stimulate symbiosis (GOURION et al., 2015).

Effector-triggered immunity (ETI) is the name given to plant defence systems that respond to specific proteins secreted by pathogenic bacteria. These effectors are directly or indirectly recognised by NB-LRRs (Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat) proteins, encoded by *R* genes, one of the largest gene families in plants (NOMAN et al., 2019).

In addition to *S. fredii* NGR234, many different α -Proteobacteria including *S. meliloti*, *Rhizobium etli*, *R. gallicum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* bv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. mongolense*, *R. tropici*, and *Bradyrhizobium* sp. (MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; AGUILAR et al., 2004) can nodulate beans. The 500 Mb *P. vulgaris* genome is distributed over eleven chromosomes that contains hundreds of plant defence genes (SCHMUTZ et al., 2014; VLASOVA et al., 2016; LOBATON et al., 2018).

S. fredii NGR234 nodulates more than 112 genera of legumes as well as the non-legume *Parasponia andersonii* (PUEPPKE AND BROUGHTON, 1999). Its genome comprises three replicons - the chromosome, a mega-plasmid and a symbiotic plasmid that contains all the essential genes for nodulation, including those for transcriptional regulation and synthesis of Nod-factors, EPS and T3SS (FREIBERG et al, 1997; SCHMEISSER et al. 2009).

Flavonoids emanating from roots acting in concert with NodD1 also control expression of T3SS genes in NGR234 via the transcriptional activator TtsI (MARIE et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2004; WASSEM, et al., 2008). The TtsI regulon includes genes that encode the T3SS effectors NopJ, NopL, NopM, NopP and NopT as well as genes for structural proteins including NopA, NopB and NopC (pilus components) and RhcN (ATPase) (VIPREY et al., 1998; MARIE et al., 2003; BARTSEV et al. 2003; AUSMEES et al., 2004; DEAKIN et al., 2005; SAAD et al., 2005; DAI et al. 2008; WASSEM et al., 2008; KAMBARA et al. 2009).

The presence or absence of NGR234 T3SS effectors affects various legumes in different ways. An active T3SS is required for efficient nodulation of the legumes as *Lablab purpureus* and *Tephrosia vogelii* for example but is not necessary for *Leucaena leucocephala* and *Vigna unguiculata* (VIPREY et al. 1998; MARIE et al., 2003; AUSMEES et al., 2004). On yet other hosts including *Crotalaria juncea*, *Pachyrhizus tuberosus* and *P. vulgaris* variety BAT93, an active T3SS system restricts nodule development (VIPREY et al. 1998; MARIE et al., 2003). Individual Nop effectors also have variable effects on different hosts. NopL stimulates

nodulation *L. purpureus* and *T. vogelii* but inhibits nodulation of *P. vulgaris* cv. BAT93 (MARIE et al., 2003). NopP is a positive effector for various legumes including *P. vulgaris* cv. BAT93 but its effects on *V. unguiculata* were negative (AUSMEES et al., 2004; SKORPIL et al., 2005; KAMBARA et al., 2009). NopT is positive for *T. vogelii* and negative for *C. juncea* (DAI et al., 2008; KAMBARA et al., 2009). NopJ was negative effector on *L. purpureus* and *P. vulgaris* cv. BAT93 (KAMBARA et al., 2009) while NopM was positive for *L. purpureus* (KAMBARA et al., 2009). Neutral effects in which the presence or absence of a Nop has no effect on nodulation were also observed including NopL for *C. juncea*, NopT for *P. tuberosus* and NopM for *P. vulgaris* cv. BAT93 (MARIE et al., 2003; KAMBARA et al., 2009).

NopM of NGR234 has a functional Novel E3 Ubiquitin Ligase (NEL) domain (XIN et al. 2012), has similarities to YopM of *Yersinia* spp. and studies with tobacco suggest that the ubiquitination activity of NopM is involved in triggering immunity (XU et al., 2018). NopM can be phosphorylated, probably by host MAPKs, but it is not known how this affects its activity (XU et al., 2018). NopT, which belongs to the YopT protease family, has auto-proteolytic activity that exposes the G50 residue, which is myristoylated in eukaryotic cells and targets the plasma membrane (DAI et al., 2008). NopL and NopP effectors do not have homologues in pathogenic bacteria (STAEHELIN & KRISHNAN, 2015). NopL is a MAP kinase substrate that can be phosphorylated at multiple sites (BARTSEV et al. 2003; ZHANG et al., 2011; GE et al., 2016). Zhang et al., (2011) observed that nodules of *P. vulgaris* (cv. Tendergreen) inoculated with a NGR234 *nopL*- mutant have increased numbers of necrotic lesions and suggested that NopL may be involved in nodule senescence. Various plant kinases can phosphorylate NopP *in vitro* and the phosphorylation site is within the N-terminal region (SKORPIL et al., 2005). Although NopP often has a positive effect on nodulation, a *S. fredii* HH103 *nopP*- mutant negatively affected nodulation of *G. max* cv Williams. Expression of the pathogenesis related (PR) gene *PR1*, was also decreased (LÓPEZ-BAENA et al., 2009).

Here we extended these investigations into Nop function by studying the global roles of *rhcN* and *nopJ* mutants of NGR234 on nodulation of *P. vulgaris*. RNA Seq and Real-time PCR analyses were used on both primordia and nodules of beans inoculated with NGR234 as well as two mutants of NGR234 deficient in the T3SS or NopJ one of the effectors. Our results suggest that NopJ has a negative effect on nodule development in *P. vulgaris*.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and growth conditions

NGR234 and its derivatives used here were cultivated at 28 °C in *Rhizobium* minimal medium (RMS) containing succinate as the carbon source (Broughton *et al.*, 1986) or TY medium (Beringer, 1974) with rifampicin at 50 mg.mL⁻¹. The mutant *rhcN* (NGR Ω *rhcN*) contains an insertion into *rhcN* that inactivates T3SS function (VIPREY *et al.*, 1998). The other mutant used (*nopJ*) was also obtained by insertion (NGR Ω *nopJ*) (KAMBARA *et al.*, 2009).

Plant inoculation

P. vulgaris cultivar BAT93 seeds were surface-sterilised in concentrated sulphuric acid for 10 minutes, then rinsed ten times with sterile water, placed on agar plates containing B & D medium (Broughton and Dilworth, 1971) and incubated for 2 d at 25 °C. Germinated seedlings were transferred to Magenta™ jars containing sterile vermiculite and watered with B & D medium. Plants were grown at a day temperature of 24 °C, a night temperature of 22 °C and light regime of 12 h that used three luminosity steps: 4 h with approximately 300 μ Einsteins.m².s⁻¹, 2 h with approximately 600 μ Einsteins and 6 h with approximately 300 μ Einsteins. Plants were inoculated with 10⁷ bacteria 3 d after transfer to Magenta™ jars and harvested 10 d later to collect nodule primordia or 21 days later to collect mature nodules. All harvested material was immediately frozen in liquid nitrogen.

RNA extraction and expression analyses

RNA-Seq

Total RNA was purified from primordia and nodules using RNAqueous® Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA 02451, USA). RNA integrity was evaluated in an Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA) and RNA concentration determined using a NanoDrop ND-8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). mRNA was enriched by depleting ribosomal RNA using RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (Thermo Fisher Scientific). Library construction and cDNA sequencing on a Life Technologies' SOLiD 4® platform (Sigma Aldrich, Life Technologies) were performed according to the manufacturer's instructions.

Using a minimum alignment of 95 %, a minimum identity of 90 %, a minimum exon coverage fraction of 0.2, tolerance of two mismatches and uniquely mapped reads, the libraries were mapped to *P. vulgaris* v1.0 genome using CLC Genomics Workbench 7.5 (QIAGEN, Redwood City, CA 94063, USA). Mapped transcripts with RPKM ≥ 5 were selected for the subsequent analyses. DESeq2 package (LOVE et al., 2014) was used to identify differential expressed genes by comparing NGR234 vs *nopJ*, NGR234 vs *rhcN* and *rhcN* vs *nopJ*, for both primordia and nodule samples. A p-value < 0.05 and an absolute fold-change ≥ 2 were considered significant for differentially expressed genes (DEGs). Functions of the selected genes were obtained using Phytozome v.2.1 (DOE Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA). Venn diagrams (<https://www.meta-chart.com/venn>) were generated to reveal DEGs that are common between primordia and nodules using Venny 2.1 programme (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny). Probable functions of common DEGs were derived using MapMan program v.3.5.1 (mapman.gabipd.org).

Quantitative RT-PCR analyses

Total RNA was purified from primordia and nodules using a RNAqueous® Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific), then treated with DNase (Turbo DNA-free - Thermo Fisher Scientific) to remove remaining DNA. A high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was used on three replicates each using 2 µg of total RNA to synthesise cDNA. The cDNA was used as templates in quantitative PCR using the SYBR® Green system (Thermo Fisher Scientific). The constitutively expressed, stable reference (housekeeping) genes *CONS7* and *EF1* (P. Schreiner and R. Wassem, unpublished) were used to standardise the procedure. Stability of the genes was checked using geNorm v 3.4 software (<https://www.qbaseplus.com/>). M values of < 0.5 were obtained for both genes.

Based on the magnitude of changed expression and their functions, six genes were selected from the sets of DEGs (*NGR234* vs *nopJ*, *NGR234* vs *rhcN* and *rhcN* vs *nopJ*) for RT-qPCR assays. Specific primers were designed for each sequence using Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Supplemental Table S1). Differential expression was performed using the method described by Vandesompele et al. (2002).

RESULTS

Nops and nodulation of *P. vulgaris*.

By inoculating beans with wild-type NGR234 as well as the mutants *rhcN* and *nopJ*, we were able to repeat the experiments of Viprey et al (1998) and P. Lariguet (unpublished) and obtained identical results – nodulation efficiency was increased when the T3SS system was inactive or *nopJ* not secreted (Figure 1).

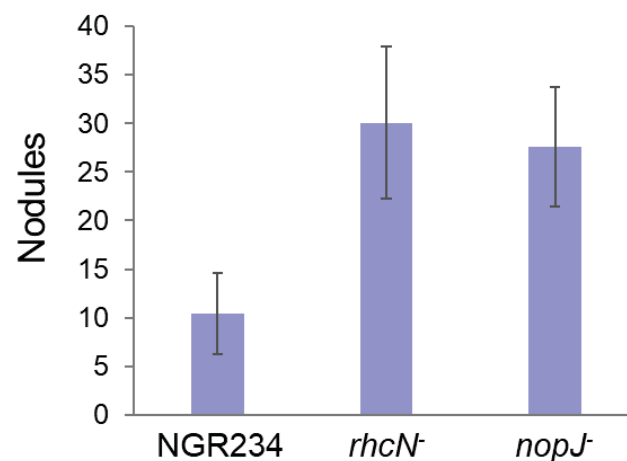


Figure 1. Nodulation of *P. vulgaris* cv BAT93 eight weeks after inoculation with wild-type NGR234 as well as the mutants *rhcN* and *nopJ*. Nodulation tests were performed with 10-14 plants.

Transcriptional profiling

Nodule primordia were collected ten days after inoculation (10 dai) when the nodules were still small, immature and unable to fix nitrogen. Mature nodules were harvested 21 days after inoculation. In cross-section, these older nodules were pink showing the presence of leghaemoglobin and thus the ability to fix nitrogen. Two biological replicates of each treatment (twelve libraries in total) were sequenced and mapped to the *P. vulgaris* genome using the CLC Workbench (numbers of mapped

readings obtained for primordia and nodules samples are shown in Supplemental Tables 2 and 3). Principal component analyses (PCA) showed that the biological replicates were closely related to each other but that primordia and nodule samples separated into two distinct clusters (Supplemental Figure S1).

Pairwise comparisons of RNA-Seq data of the sets NGR234 x *nopJ*, NGR234 x *rhcN* and *rhcN* x *nopJ* for both primordia and nodule samples were analysed (Supplemental tables 4 and 5). Also, primordia (P) and nodule (N) samples were compared for each strain: NGR234 P x N, *rhcN*- P x N and *nopJ* P x N (Supplemental table 6). In all comparisons, only genes whose expression changed ≥ 2 with a probability of $p \leq 0.05$ (DEGs) were considered for further analysis. Six genes were selected for validation by Real-time qPCR (RT-qPCR) based on their fold change values. The group included genes that showed differential expression in primordia and/or nodule samples from different comparisons producing 16 differential expression conditions. Thirteen of the samples analysed gave similar results to those obtained by RNAseq (Figure 2).

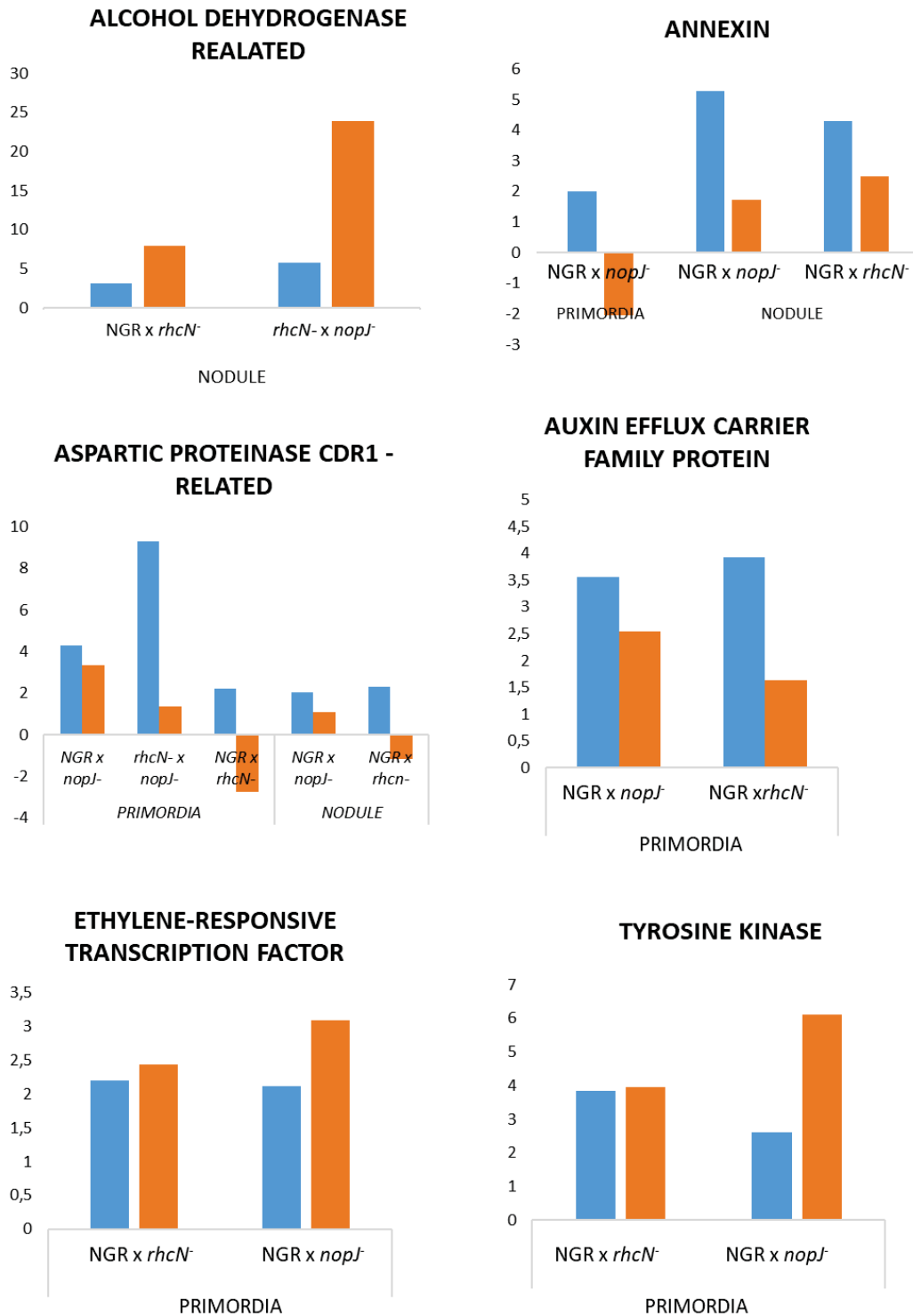


Figure 2. RNAseq (blue bars) and RT-qPCR (orange bars) analyses of differentially expressed genes in primordia and nodules of *P. vulgaris* inoculated with NGR234 and *rhcN*⁻ and *nopJ*⁻ mutants. Values are expressed in fold change. The second of the paired strains (indicated under the bars) shows up or down regulation.

Genes whose expression varies with effector

Our hypothesis was that *P. vulgaris* responds in different ways to various components of the T3SS and to test it, we studied those genes whose expression varied with effector. In samples of primordia, nine hundred and thirty three genes were up- or down-regulated, whereas nine hundred and twenty seven DEGs were similarly modulated in nodules (Figure 3). Very few of these DEGs were common between comparisons of NGR234 x *rhcN*-, NGR234 x *nopJ*- and *rhcN*- x *nopJ*- as Venn diagrams showed (Figure 4). Only three common DEGs were found in primordia - phvul.009g178900, that is involved in photosynthesis, phvul.006g207800 which plays a role in flavonoid synthesis and phvul.005g045800 a defence gene. Nodules contained only two DEGs - phvul.003g224600 involved in root development and phvul.001g076700 another defence gene.

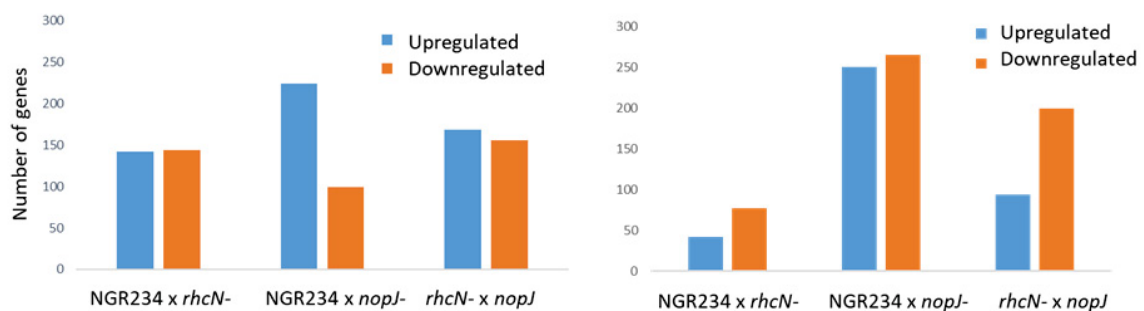


Figure 3. Differentially expressed genes (DEGs) that were up- or down-regulated in primordia (A) or nodules (B) of *P. vulgaris* as a result of inoculation with wild-type NGR234 or its T3SS mutants. Whether a gene is up- or down-regulated is shown as the first strain in the comparisons.

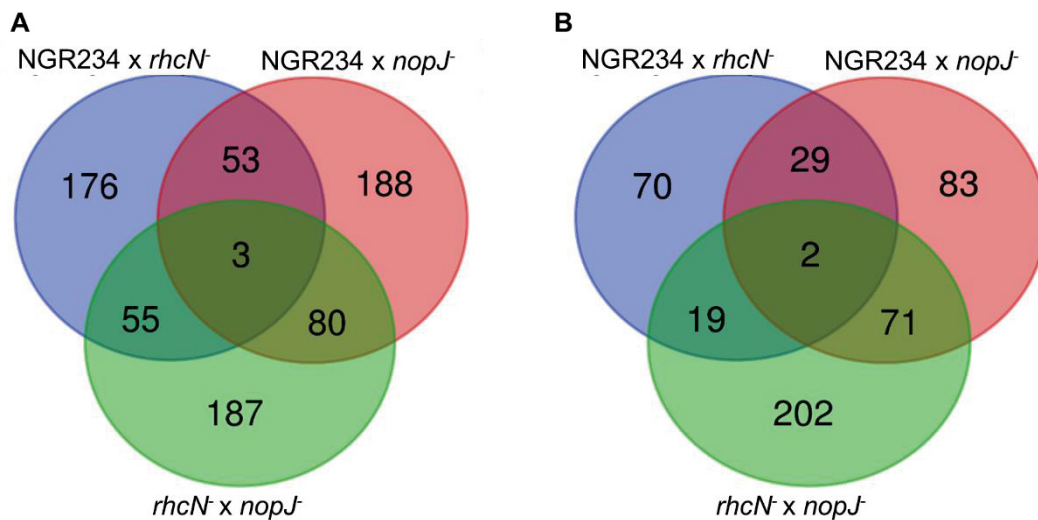


Figure 4. Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) that were up- or down-regulated in primordia (A) or nodules (B) of *P. vulgaris* following inoculation with wild-type NGR234 or its T3SS mutants. Comparisons are between NGR234 vs *nopJ*, NGR234 vs *nopM* and NGR234 vs *rhcN* on primordia (A) and nodules (B).

Nop induced changes in cellular functions

The DEGs observed in each pairwise comparison were assigned to functional classes using MapMan v.3.5.1 (Figure 5A for primordia and 5B for nodules). We focused on genes possibly involved in plant-microbe interactions including hormone synthesis, glutathione-S-transferase, peroxidases, PR proteins and transcription factors. When comparisons were made between plants inoculated with wild-type NGR234 and the *rhcN* mutant, twenty-five of these genes were found to be differentially expressed and Heatmaps showed clear separation between NGR234 and the mutant in which the entire T3SS was inactive (Figure 6).

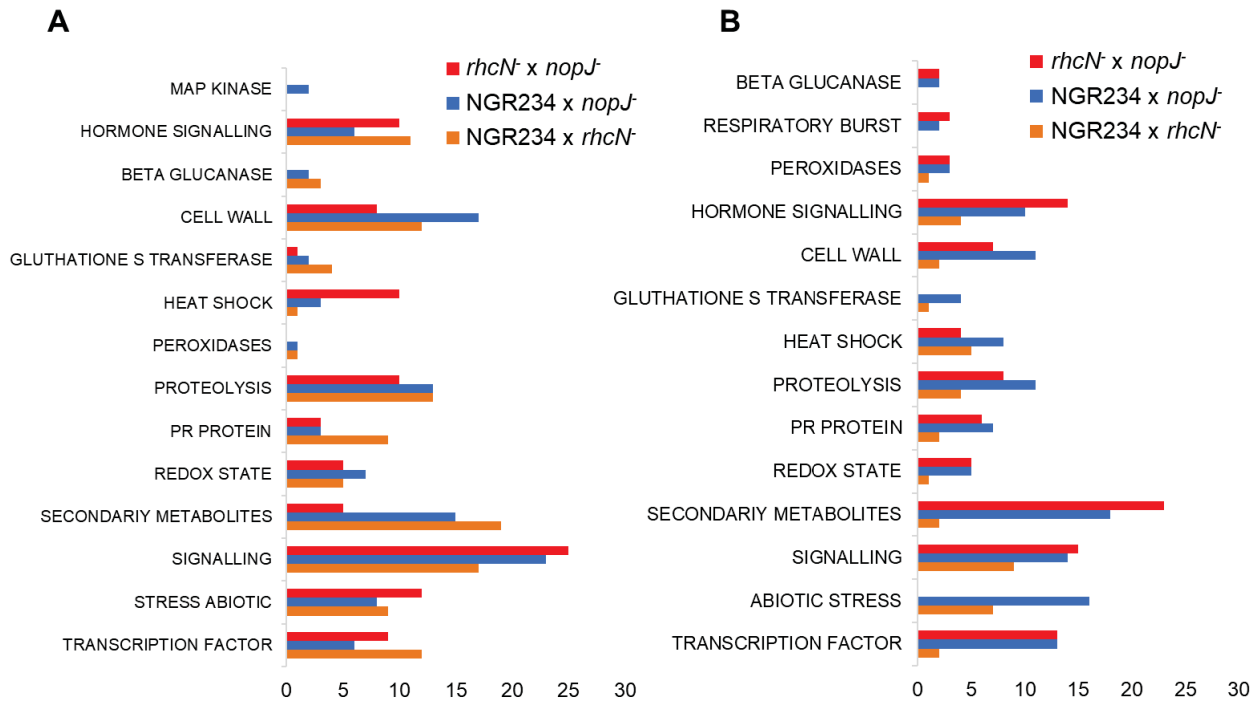


Figure 5. Classification of differentially expressed genes (DEGs) that were up- or down-regulated in primordia (A) or nodules (B) of *P. vulgaris* following inoculation with wild-type NGR234 or its T3SS mutants. Comparisons were between NGR234 vs *nopJ*, *rhcN* vs *nopJ* and NGR234 vs *rhcN* on primordia (A) and nodules (B). Classifications were obtained using Mapman v 3.5.1.

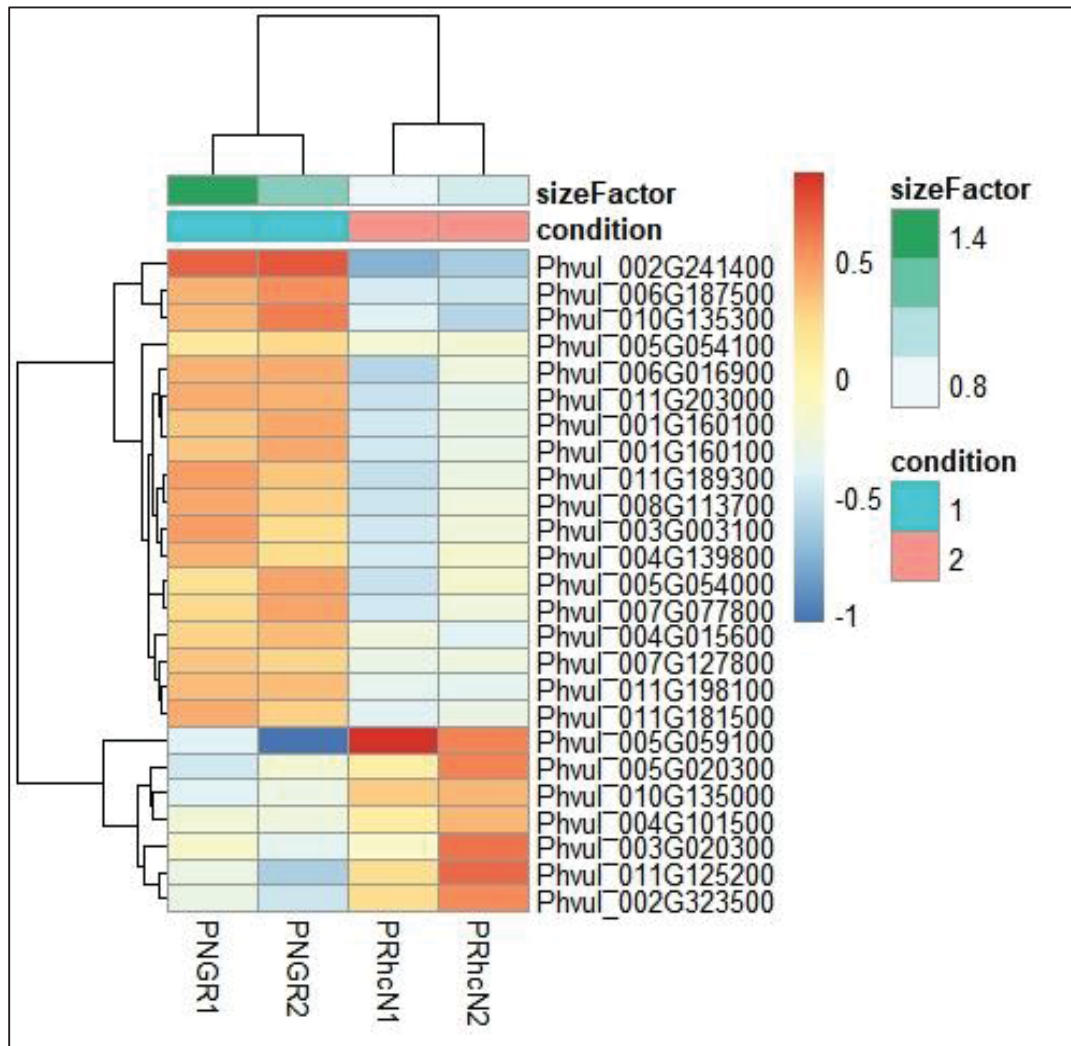


Figure 6. Heatmaps of differentially expressed genes (DEGs) that were up- or down-regulated in primordia (A) or nodules (B) of *P. vulgaris* following inoculation with wild-type NGR234 or the T3SS mutant *rhcN*. The categories recognised were: hormone synthesis, glutathione S transferase, peroxidase and PR proteins.

Effect of NGR234 and its mutants on gene expression in primordia and nodules

1. PR proteins

PR (Pathogenesis-related) proteins are activated when plants are under physical stresses or attacked by pathogens (EDREVA, 2005; JAIN & KHURANA, 2018) but they may also play roles in germination (JAIN & KHURANA, 2018).

In comparisons of primordia resulting from infection with wild-type NGR234 or the *rhcN* mutant, nine DEGs that encode PR proteins were found. Phytozome v2.1 analyses showed that all were homologues of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* PR genes. Seven of these genes (phvul.002g323500, phvul.004g015600, phvul.004g139800, phvul.007g077800, phvul.011g181500, phvul.011g198100, phvul.011g203000) were highly expressed in plants inoculated with NGR234. Obviously, these same genes were not induced by inoculation with the T3SS mutant *rhcN*. Inactivation of specific *nop*-genes (e.g. *nopJ*) lead to the down-regulation of only phvul.007g077800.

The NGR234 x *nopJ* comparison in nodules showed that three PR genes were up regulated - phvul.004g138500, phvul.006g196900 and phvul.011g202900. The last two genes are homologues of *A. thaliana* and *O. sativa* PR genes and are probably involved in the NopJ recognition or response by the plant.

2. Hormones

Hormones play broad roles in plant development, protection from abiotic stresses as well as defence against microorganisms and insects. Moreover, hormones are involved in long-distance signalling (STEUDLE, 2000; KLUMPP & KRIEGLSTEIN, 2002).

When plants inoculated with NGR234 or *rhcN* were compared, thirteen DEGs involved in hormone signalling within primordia were found. Amongst them, seven (phvul.001g160100, phvul.006g016900, phvul.006g187500,

phvul.007g127800, phvul.009g256400, phvul.010g135300, phvul.011g189300) were more expressed when *P. vulgaris* was inoculated with NGR234. Two (phvul.007g127800 and phvul.001g160100) encode ethylene-responsive transcription factors.

In NGR234 x *rhcN* comparisons, four genes encoding linoleato 9S-lipoxygenase isoforms were found. In primordia, phvul.010g135000 was upregulated by the *rhcN* mutant while phvul.010g135300 was upregulated by NGR234. In nodules, phvul.010g135500 and phvul.010g134900, were both upregulated by inoculation with NGR234.

3. Receptor-like kinases

Mapman classified several DEGs as transcription factors and all of them encode for receptor-like kinases (RLKs). Leucine-rich repeat receptor kinases (LRR-RKs) comprise the largest subfamily of transmembrane receptor-like kinases in plants. Comparisons of transcripts in nodule primordia of plants inoculated with NGR234 or the *rhcN* revealed eight LRR-RKs-like DEGs, being seven of which (phvul.002g123500, phvul.006g180200, phvul.001g071200, phvul.011g152100, phvul.008g126800, phvul.006g137000, phvul.003g168000) upregulated by NGR234. The gene phvul.002g123500 was also up regulated by NGR234 in the comparison NGR234 x *nopJ*-.

Seven differentially expressed LRR-RKs were found in nodules. Four were upregulated by NGR234 (phvul.004g136500, phvul.002g187300, phvul.008g047800 and phvul.006g180200).

4. Glutathione-S-Transferases

Glutathione S-transferases (GSTs) belong to a ubiquitous superfamily of multifunctional enzymes involved in cellular detoxification as well as responses to both abiotic and biotic and stresses (MCGONIGLE et al., 2000; KIM et al., 2011). In primordia, five DEGs belonging to the Glutathione S-transferase group were

upregulated by NGR234: three genes (phvul.005g054000, phvul.005g054100 and phvul.008g113700) in comparison to *rhcN*, and two genes (phvul.002g241400 and phvul.010g066900) in comparison to *nopJ*. In nodules, four genes were also up regulated by NGR234 (phvul.008g1954000, phvul.007g134700, phvul.001g002000 and phvul.002g080100) in comparison to *nopJ*. These data suggest that beans recognise Nops that trigger expression of GST genes involved defence responses.

5. Peroxidases

Pathogens induce peroxidases that are involved in the metabolism of reactive oxygen species (ROS), the formation of lignin and phyto-alexin synthesis (ALMAGRO et al., 2009; BINDSCHEDLER et al., 2006). Two peroxidase genes were upregulated in primordia following inoculation with NGR234, phvul.003g003100 in comparison to *rhcN* mutant, and phvul.010g066900, in comparison to *nopJ* strain. In nodules, NGR234 induced expression of two genes (phvul.001g106600 and phvul.006g129700) when compared to *nopJ* strain. All four genes which are homologues of *A. thaliana* and *O. sativa* peroxidases were more strongly expressed under conditions where nodulation was less efficient. Possibly phvul.003g003100 plays a role in resistance to anthracnose (TRABANCO et al., 2015).

Genes Differentially Expressed in Primordia x Nodules Comparisons

Comparisons of genes expressed in primordia and nodules inoculated with wild-type NGR234 and mutants thereof, showed that the numbers of differentially expressed genes (DEGs) were similar in all cases (Figure 7A). Indeed, Venn diagrams clearly demonstrated that about 50 % of all DEGs found were the same whether plants were inoculated with wild-type NGR234, the *rhcN* mutant or the *nopJ* mutant (Figure 7B). This vast number of DEGs, almost 3,000, reflects the complexity of development of a new organ, the nodule. Others have reached similar

conclusions. O'ROURKE et al. (2014) inoculated *P. vulgaris* with *Rhizobium tropici* strain CIAT899, compared primordia (five days after inoculation) and nodules (twenty one days after inoculation) and found 2,932 differentially expressed transcripts.

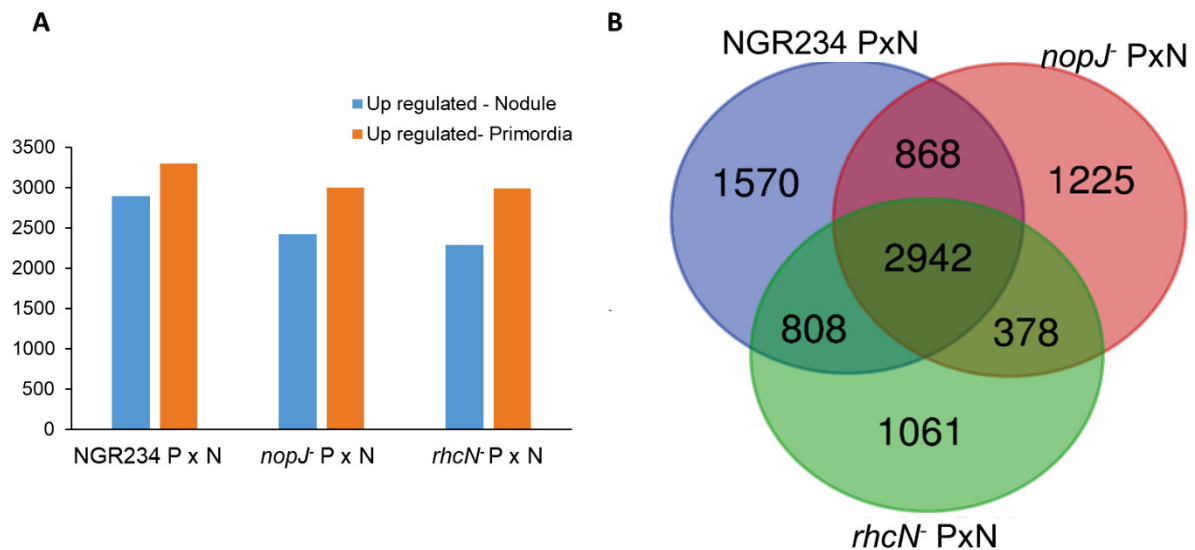


Figure 7. Differentially expressed genes (DEGs) that were up- or down-regulated in primordia (P) or nodules (N) of *P. vulgaris* following inoculation with wild-type NGR234 or its T3SS mutants (A). (B) - Venn diagrams showing comparisons between NGR234 vs *nopJ*, *rhcN* vs *nopJ* and NGR234 vs *rhcN* on primordia (P) and nodules (N).

DEGs observed in each pairwise comparison were distributed in functional classes using MapMan v.3.5.1 program. DEGs from these comparisons were categorized into various groups, including hormone synthesis, peroxidases, abiotic stress, glutathione S transferase, PR proteins, transcription factors, signalling, secondary metabolism and cell wall synthesis (Figure S2).

DISCUSSION

Inoculation of beans with NGR234 in which the entire T3SS had been inactivated, resulted in more up-regulated genes in primordia than nodules. Seven DEGs that encode PR proteins were found when *rhcN* was inactivated, eight that code for hormones, eight for receptor like-kinases and three for glutathione-S-transferases. Only with receptor-like kinases and glutathione-S-transferases were equal numbers or more genes differentially expressed in nodules. Silencing of *nopJ* had a much less general effect - one PR protein, hormone, one receptor-like kinase and one peroxidase gene were differentially expressed in primordia. Absence of *nopJ* only affected expression of a single peroxidase gene in nodules.

These data suggest that the complete absence of secreted proteins has a much more general effect on *P. vulgaris* than absence of NopJ alone. This was expected, since the array of different Nops have effects on beans varying from positive to negative to neutral.

Various studies have shown that ethylene is produced by plants in response to rhizobial infection where it functions as a negative regulator of nodulation (LIGERO et al., 1986; BUHIAN & BENSMIHEN, 2018). Exogenous ethylene reduces nodule numbers in several legumes, while inhibitors of ethylene synthesis or perception generally increase nodule numbers (LOHAR et al., 2009; FERGUSON & MATHESIUS, 2003; GUINEL & GEIL, 2002). That the ethylene-responsive transcription factors encoded by the genes phvul.007g127800 and phvul.001g160100 were up-regulated in beans inoculated with NGR234, is entirely in accord the negative effects of ethylene on nodulation.

Enzymes belonging to the lipoxygenase (LOXs) family catalyse the first step in conversion of polyunsaturated fatty acids derived from membrane lipids to Oxylipins (FEUSSNER & WASTERNAK, 2002). There are two different plant LOX subgroups, the poorly studied 9-LOX subgroup and 13-LOX, which is involved in the production of jasmonate (ACOSTA et al., 2009; CHAUVIN et al., 2013). The *P.*

vulgaris genome contains thirteen LOX genes clustered on chromosome 10. All belong to the subgroup 9-LOX. Five of these genes were differentially expressed, but since little is known about them, we can only speculate that they too play a role in restricting nodulation by NGR234.

RLKs are a super-family of structurally similar proteins consisting of an extra-cellular region, a single membrane-spanning domain and an intra-cellular kinase domain. Plant RLKs have evolved a diverse complement of extracellular domains (> 20) including leucine-rich repeats (LRR), self-incompatibility (S) domains, epidermal growth factor repeats and lectin domains (COCK *et al.* 2002; SHIU & BLEEKER, 2001). LRKs that contain domains such as LRR-RK and Duf26 are involved in defence.

Under stress conditions, GST genes respond to biotic and abiotic stresses, such as pathogen attack, H₂O₂, heavy metals, heat shock, dehydration, wounding, biotic elicitors and toxic chemicals (GONG *et al.* 2005; URBANEK *et al.* 2005) in different ways.

Our results are similar to those published that document large numbers expressed genes (involved in defence genes, hormone synthesis, stress responses) during the initial phase of bacterial/plant symbioses (GOURION *et al.* 2015). When nodules have been established, expression of defence and stress response genes declines (DEAKIN & BROUGHTON, 2009).

REFERENCES

ACOSTA, I.F. et al. Tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. **Science**. 2009 Jan 9;323(5911):262-5. 2009.

AGUILAR, M.O.; RIVA, O.; PERLTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **PNAS**. 37: 13548-13553. 2004.

ALMAGRO, L.; GOMEZ, L.V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO A.; PEDRENO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **J Exp Bot**. 60(2):377-90. 2009.

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

BARSTEV, A.; BOUKLI, N.M.; DEAKIN, J.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. **FEBS Letters**, v.554, n.,p. 271-274. 2003.

BERINGER, J.E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J Gen Microbiol** 84: 188–198. 1974.

BINDSCHEDLER, L.V., DEWDNEY, J., BLEE, K.A., STONE, J.M. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. **Plant J**. 47(6):851-63. 2006.

BROUGHTON, W.J., WONG, C.H., LEWIN, A., SAMREY, U., MYINT, H., MEYER, A.H., *et al.* Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. **J Cell Biol** 102: 1173–1182. 1986.

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

BUHIAN, W. P.; BENSMIHEN, S. Mini-Review: Nod Factor Regulation of Phytohormone Signaling and Homeostasis During Rhizobia-Legume Symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. Vol 9, Article 1247. 2018

CHAUVIN, A. *et al.* Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. **New Phytologist**.v.197, p.566–575. 2013.

COCK, J.M., VANOOSTHUYSE, V., GAUDE, T. Receptor kinase signaling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. **Curr Opin Plant Biol.** 14:230–6. 2002.

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

DEAKIN, W.J.; MARIE, C.; SAAD, M.M.; KRISHNAN, H.B.; BROUGHTON, W.J. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **Mol Plant Microbe Interact.** v.18, p:499-507. 2005.

DEAKIN, W.J., BROUGHTON, W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nat Rev Microbiol** 7: 312-32. 2009.

DIEPOLD, A., WAGNER, S. Assembly of the bacterial type III secretion machinery. **FEMS Microbiol Rev.**38:802-22. . 2014.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. **Gen Appl Plant Physiol** 31:105-124. 2005.

FEUSSNER, I., WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annu Rev Plant Biol.** 2002; 53:275-97. 2002.

FERGUSON, B.J., MATHESIUS, U. Signalling Interactions During Nodule Development. **Journal of Plant Growth Regulation** 22:47-72. 2003.

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

GE, Y-Y., XIANG, Q-W., WAGNER, C., ZHANG, D., XIE, Z-P., STAEHELIN, C. The type 3 effector NopL of Sinorhizobium sp. strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 67, No. 8 pp. 2483–2494. 2016.

GONG, H., ZHU , X. , CHEN, K., WANG, S., ZHANG, C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science** 169. 313–321. 2005.

GOURION, B., BERRABAH, F., RATET, P., STACEY, G. Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. **Trends in Plant Science**. Vol. 20, No. 3. 186-194. . 2015.

GUINEL, F. and GEIL, R. A Model for the Development of the Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses in Legumes and Its Use to Understand the Roles of Ethylene in the Establishment of these two Symbioses. **Canadian Journal of Botany** 80(7):695-720. 2002.

JAIN, D., KHURANA, J.P. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In: Singh A., Singh I. (eds) **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. Springer, Singapore. 2018.

KAMBARA, K.; ARDISSONE, S.; KOBAYASHI, H.; SAAD, M.M.; SCHUMPP, O.; BROUGHTON, W.J.; DEAKIN, W.J. Rhizobia utilize homologues of pathogenic effector proteins during symbiosis. **Mol. Microbiol.**, vol. 71, p. 92-106. 2009.

KIM, S., ANDAYA, V. C. and TAI, T. H. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. **Biochem. J.** 435:373–380. 2011.

KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. **Eur. J. Biochem.** 269: 1067-71. 2002.

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.

LIGERO, F., LLUCH, C., OLIVARES, J. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. **J. Plant Physiol.** 125:361-365. 1986.

LOBATON, J. D.; MILLER, T et al. Resequencing of Common Bean Identifies Regions of Inter-Gene Pool Introgression and Provides Comprehensive Resources for Molecular Breeding. **Plant Genome** . 11:170068. 2018.

LOHAR, D. P. et al. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. **Annals of Botany**. 104(2):277-85. 2009.

LÓPEZ-BAENA, F.J.; RUIZ-SAINZ, J.E.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; VINARDELL, J.M. Bacterial Molecular Signals in the *Sinorhizobium fredii*-Soybean Symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 755.2016.

LOPEZ-BAENA, F.J.; MONREAL, J.A.; PEREZ-MONTANO, F.; GUASCH-VIDAL, B.;

LOVE, M.; HUBER, W. ; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol.** 15(12):550. 2014.

MCGONIGLE, B., KEELER, S. J., LAU S.-L. C., KOEPPE, M. K., O'KEEFE, D. P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiol.** 124, 1105–1120. 2000.

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.

MARIE, C.; DEAKIN, W.J.; VIPREY, V.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H.; PERRET, X.; BROUGHTON, W.J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.16, p:743-51. 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**. 252: 11–23. 2003.

NOMAN, A.; AQEEL, M.; LOU, Y. PRRs and NB-LRRs: From Signal Perception to Activation of Plant Innate Immunity. **Review in Int. Journal of Molecular Sciences**. v.20. 2019.

O'ROURKE, J.A.; INIGUEZ, L.P.; FU, F.; BUCCIARELLI, B.; MILLER, S.S.; JACKSON, S.A.; MCCLEAN, P.E.; LI, J.; DAI, X.; ZHAO, P.X.; HERNANDEZ, G.; VANCE, C.P. An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. **BMC Genomics**. 6:15-866. 2014.

POOLE, P., RAMACHANDRAN, V., and TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nat. Rev. Microbiol**. 16, 291–303. 2018.

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.

SAAD, M.M.; KOBAYASHI, KOBAYASHI,H; MARIE, C; BROWN, I.R.; MANSFIELD, J.W, BROUGHTON, W.J.; DEAKIN, W.J. NopB, a type III secreted

protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p: 1173-81. 2005.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSCIAK, D.; BAKKOU, N.; LE QUÉRÉ, A.; WOLLERR, A.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTER, B.; POMMERENING-ROSER, A.;

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A.; CANNON, S.B.; GRIMWOOD J. et al.. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nat. Genet.** 46(7):707–713. 2014

SHIU, S.H., BLEEKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proc Natl Acad Sci.** 98:10763–68. 2001.

SKORPILI, P.; SAAD, M.M.; BOUKLI, N.M.; KOBAYASHI, H.; ARES-ORPEL, F., BROUGHTON, W.J.; DEAKIN, W.J. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. **Molecular Microbiology**, v.57, p:1304-17. 2005.

STAEHELIN, C. & KRISHNAN, H. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. **Biochem. J.** v.470, p: 263–274. 2015.

STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. **J.Exp. Bot.** 51: 1531-1542. 2000.

TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Identification of a new chromosomal region involved in the genetic control of resistance to anthracnose in common bean. **The Plant Genome**, v.8, n.2, p.1-11, 2015.

URBANEK, H. et al. Induction of Glutathione S-Transferase and L-cystathionine by Toxic Compounds and Elicitors in Reed Canary Grass. **Biotechnology Letters** 27(13):911-4. 2005.

VIPREY, V., DEL GRECO, A., GOLINOWSKI, W., BROUGHTON, W.J., and PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol Microbiol** 28: 1381–1389. 1998.

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIERREZ, S.; RENDON-ANAYA, M.; HERNANDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E. ERB, I. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biol.** 17:32. 2016

WASSEM, R., KOBAYASHI, H., KAMBARA, K., LE QUERE, A., WALKER, G. C., BROUGHTON, W. J. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. **Mol. Microbiol.** 68 736–748. 2008.

XIN, D. ; LIAO, S. ; XIE, Z. ; HANN, D. R. ; STEINLE, L. ; BOLLER, T. ; STAEHELIN, C. Functional Analysis of NopM, a Novel E3 Ubiquitin Ligase (NEL) Domain Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **PLoS Pathog** 8(5): e1002707. 2012.

XU, C-C.; ZHANG, D.; HANN, D.R. ; XIE, Z-P. ; STAEHELIN, C. Biochemical properties and in planta effects of NopM, a rhizobial E3 ubiquitin ligase. **Journal of biological chemistry.** 293, 15304-15315. 2018.

ZHANG, L.; CHEN, X.J.; LU, H.B.; XIE, Z.P.; STAEHELIN, C. Functional analysis of the type 3 effector NopL from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation and interference with MAPK signaling. **Journal of Biological Chemistry**. v.37, p: 32178-3287. 2011.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1. *Phaseolus vulgaris* genes selected for validation by RT-qPCR.

GENE	PRIMER	SEQUENCE (5'→3')
Phvul.005G030100	ANNEXIN-F	CTTGGCAGTGAGATCTGCTT
Phvul.005G030100	ANNEXIN-R	CCAAAAGCTGACGAAGATGGC
Phvul.005G045800	CDR1-F	TTGATCTCATCCCACGCCAC
Phvul.005G045800	CDR1-R	TGGCAGCACTTTTCACTTGC
Phvul.002G123500	TYRO-F	AGCTAGAAGACTCACAACCTTTTGC
Phvul.002G123500	TYRO-R	TTCCATATTCTGGAGGAGCATAACC
Phvul.004G092100	ETHYLENE-F	TCAAGGAGACTCATCTTCAGTGAC
Phvul.004G092100	ETHYLENE-R	GGTGTAGTTTCAGTAACAGCCG
Phvul.002G117700	AUXIN-F	TCATCAGGAAATATGGGCAACC
Phvul.002G117700	AUXIN-R	CAAACGTCACGTGCACCAAA
Phvul.001G064000	ALCOHOL-F	CAATGGAGGTGTGGATCGGG
Phvul.001G064000	ALCOHOL-R	AAGACCCCAACCATCGTGGA

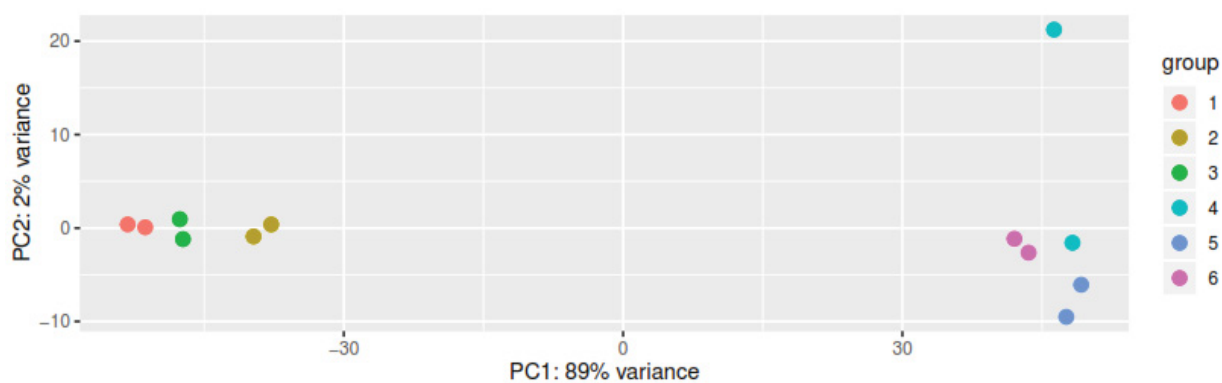
Table S2. SUMMARY OF MAPPING OF SEQUENCES OBTAINED FROM PRIMORDIA OF NODULES AGAINST THE GENOME OF *Phaseolus vulgaris* USING CLC GENOMICS WORKBENCH v 7.5

Libraries	Number of readings	Number of readings after trimming	% of trimmed readings	Number of mapped readings	% of readings mapped in <i>P. vulgaris</i>
NGR1	66.355.125	35.098.658	52,90%	13.831.025	39,40%
NGR2	53.945.926	26.449.182	50,00%	18.133.642	87,88%
NopJ1	40.823.619	20.633.572	50,54%	13.651.079	66,16%
NopJ2	60.291.398	33.583.553	55,70%	19.085.961	56,83%
RhcN1	40.534.674	19.623.321	48,41%	12.580.825	64,11%
RhcN2	50.599.355	23.469.908	46,38%	13.831.025	59,00%

Table S3. SUMMARY OF MAPPING OF SEQUENCES OBTAINED FROM NODULES AGAINST THE GENOME OF *Phaseolus vulgaris* USING CLC GENOMICS WORKBENCH v 7.5

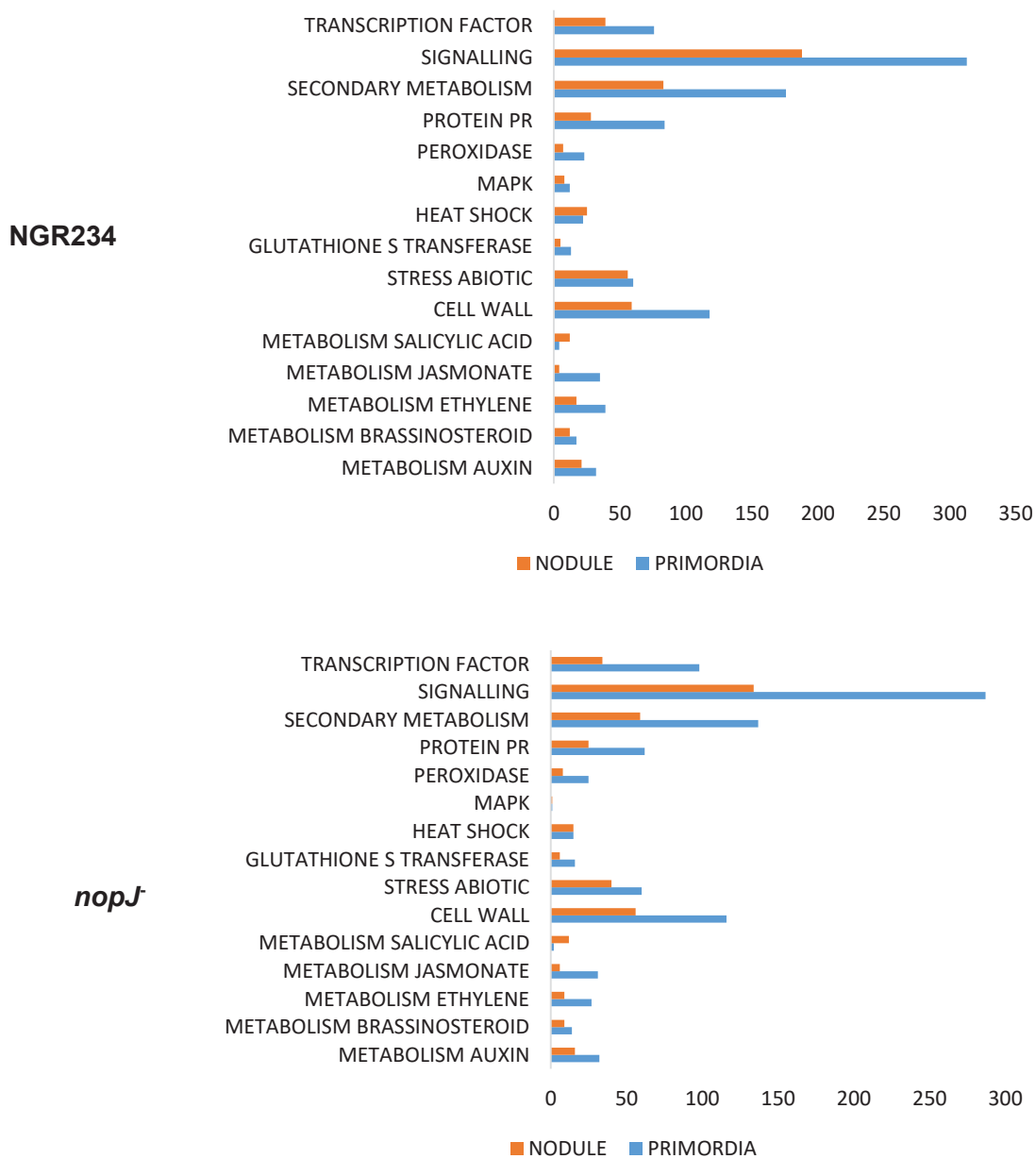
Libraries	Number of readings	Number of readings after trimming	% of trimmed readings	Number of mapped readings	% of readings mapped in <i>P. vulgaris</i>
NGR1	19.701.651	11.244.315	57,07%	6.405.297	57,00%
NGR2	12.387.920	6.837.083	55,19%	4.335.855	63,41%
NopJ1	7.420.281	3.636.516	49,00%	1.831.647	50,36%
NopJ2	13.472.173	7.226.751	53,64%	3.732.822	51,65%
RhcN1	13.486.498	7.303.411	54,15%	4.210.958	57,65%
RhcN2	12.326.585	7.051.507	57,20%	3.900.978	55,32%

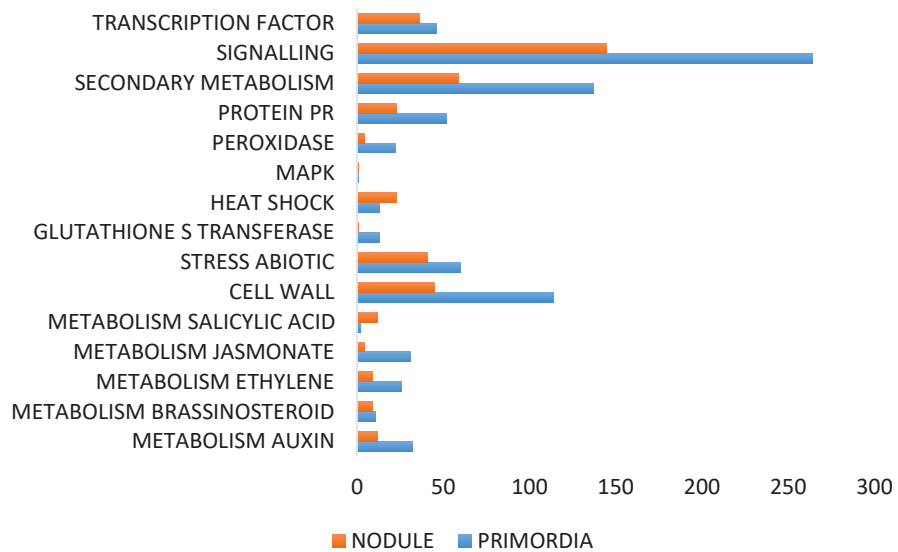
Figure S1. Principal component analysis (PCA) of transcriptome of all 16 RNAseq libraries.



Libraries 1 to 3, primordia samples: 1: NGR; 2: *nopJ*; 3: *rhcN*. Libraries 4 to 6 nodule samples: 4: NGR; 5: *nopJ*; 6: *rhcN*.

Figure S2. Primordia x nodule DEGs from *P. vulgaris* inoculated with strain NGR234 wild type *rhcN* and *nopJ* strains categorized by Mapman v.3.5.1 program.



rhcN

6 DISCUSSÃO FINAL

A análise do transcriptoma de *P. vulgaris* inoculado com as estirpes selvagem NGR234 e mutantes *nopJ*- e *rhcN*- resultou em 1860 genes diferencialmente expressos, sendo 933 mais expressos em primórdios de nódulo e 927 em nódulos. Foram encontrados genes comuns às comparações em primórdios e em nódulo. Em primórdio, três genes são comuns as três comparações, e estão envolvidos na fotossíntese, resposta de defesa e síntese de flavonóides. Em nódulos, dois genes são comuns às três comparações e estão envolvidos no desenvolvimento vegetal e resposta de defesa.

A partir dos genes diferenciais encontrados nas comparações em primórdio e nódulos, seis genes foram selecionados para serem validados por RT-qPCR. Entre as 16 condições testadas envolvendo as estirpes selvagem *S. fredii* NGR234 e mutantes *nopJ*- e *rhcN*- em primórdios de nódulo e nódulos, apenas 3 não concordaram com o valor de *fold change* encontrado no RNAseq. Por outro lado, os valores de *fold change* obtidos na validação por RT-qPCR da maioria das comparações envolvendo *nopM*- não concordaram com o RNAseq. Além disso, os genes obtidos das bibliotecas geradas a partir de primórdios e nódulos inoculados com a estirpe *nopM*- apresentaram valores muito discrepantes das outras bibliotecas. Desta forma, optou-se por não abordar as comparações que envolveram *nopM*- no artigo a ser publicado. Alguns dados obtidos com os DEGs das comparações envolvendo *nopM*- estão descritos no Apêndice deste trabalho.

Os genes diferencialmente expressos observados com a estirpe selvagem e os mutantes *nopJ*- e *rhcN*- estão envolvidos em diversos processos biológicos como defesa da planta, resposta à estresse, síntese de hormônios, desenvolvimento da planta e transporte de compostos. Algumas categorias funcionais ajudaram a explicar a variação de nodulação em *P. vulgaris* quando inoculada com as estirpes selvagem e mutantes.

Os resultados sugerem que genes que codificam para proteínas PR, envolvidas na ativação de defesa da planta, foram mais expressos em primórdios de nódulos inoculados com NGR234 na comparação NGR234 x *rhcN*-. A expressão de genes PR em feijão comum inoculado com a estirpe selvagem *S. fredii* NGR234, sugere que a presença de um sistema de secreção tipo III ativo, pode estar desencadeando a resposta de defesa da planta ao secretar as cinco proteínas efetoras Nop (NopM, NopL, NopP, NopL e NopJ) para o interior da célula vegetal. Trabalhos anteriores mostraram um aumento da expressão de genes envolvidos na resposta de defesa de leguminosas, em estágios iniciais da interação, sendo esta resposta suprimida após o reconhecimento da bactéria pela planta, permitindo assim o estabelecimento e desenvolvimento do nódulo (LOHAR et al., 2006; BRECHENMACHER et al., 2008; LIBAULT, et al., 2010). Este resultado encontrado em primórdios de nódulo, também pode ajuda a explicar a variação da nodulação existente

entre as estirpes selvagem *S. fredii* NGR234 e mutantes *nopJ-* e *rhcN-*, já que a estirpe selvagem tem uma nodulação menor se comparada com os dois mutantes. Estes fenótipos foram observados anteriormente pelo grupo do Dr. William Broughton (Lariguet dados não publicados) e confirmados em testes de nodulação deste trabalho.

Os genes que foram categorizados como envolvidos na síntese de hormônios foram observados em ambas as fases de desenvolvimento de nódulo. Hormônios estão envolvidos em diversos processos como desenvolvimento da planta, simbiose e sinalização para ativação da resposta de defesa. Em primórdios de nódulo, na comparação NGR234 x *rhcN-*, genes que codificam para proteínas com domínio AP2/ERF (APETALA2/Ethylene Responsive Factor) estavam mais expressas em *P. vulgaris* inoculados com estirpe selvagem NGR234. Nesta mesma comparação, observamos um gene que codifica para enzima 12-oxophytodienoate redutase mais expresso em *P. vulgaris* inoculado com NGR234. Esta enzima está envolvida na via de síntese de ácido jasmônico, outro hormônio que já se sabe estar envolvido na sinalização para ativação da defesa da planta.

Entre os DEGs observados também foram identificados genes que codificam para enzimas da família da lipoxigenase (LOX), que apresenta papel na defesa da planta. Estes genes estavam mais expressos em *P. vulgaris* inoculado com a estirpe selvagem, na comparação NGR234 x *rhcN-* em primórdios e nódulos. A maior expressão de genes que codificam para LOX em *P. vulgaris* inoculado com a estirpe selvagem, sugere que a resposta de defesa deve ser ativada pela presença de T3SS, o que não ocorre quando inoculado com o mutante *rhcN-*. Este resultado está de acordo com um estudo que mostrou a maior expressão de genes que codificam LOX em plantas submetidas à infecção de patógeno. Song et al., (2016) observaram uma maior expressão de genes LOX em *Arachis duranensis* (amendoim) nos primeiros dias de infecção do fungo *Aspergillus flavus*.

A categoria de fatores transcricionais apresentou o maior número de genes agrupados. Tanto em primórdios quanto em nódulos, famílias de domínios de fatores transcricionais como MYB, LRR, bZIP e DUF foram encontrados. Esses grupos de fatores transcricionais estão envolvidos na resposta ao stress biótico, abiótico e durante a simbiose, atuando na transdução de sinal e expressão de genes durante estes processos (LIBAULT et al., 2009; WANI et al., 2013). O domínio DUF está presente em proteínas que atuam na resposta de defesa, simbiose e crescimento. Este trabalho encontrou 3 genes mais expressos em NGR234, classificados como genes que codificam para proteínas receptoras quinase com domínio DUF, em primórdio e em nódulo.

Gourion et al., (2015) propuseram uma cascata de sinalização para explicar a supressão da defesa do hospedeiro após a infecção do rizóbio. Eles sugerem a presença de proteínas *symCRK* com domínio DUF26, interagindo com proteínas na membrana da

parede celular bacteriana, levando a supressão de compostos de defesa da planta. Berrabah et al (2014) observaram que a ausência da proteína SymCRK que apresenta domínio DUF em *Medicago truncatula*, gerou nódulos pouco desenvolvidos e indução da resposta de defesa na interação com *Sinorhizobium meliloti* estirpe Rm41.

Os três genes mais expressos em NGR234 foram encontrados por Quezada et al. (2019), que descreveram 46 genes que codificam proteínas receptores quinase da subfamília CLK (Cysteine-rich receptor like protein) em *P. vulgaris*. Eles encontraram genes que atuam na ativação da resposta de defesa e no reconhecimento durante a simbiose. Além disso, Quezada et al. (2019) sugerem que um dos genes mais expressos em NGR234 em nódulo, na comparação NGR234 x *nopJ*-, apresenta região promotora que responde à hormônio. Sendo assim, os 3 genes mais expressos em NGR234, podem estar induzindo a resposta de defesa em *P. vulgaris*. Fato que explicaria a eficiência de nodulação menor de NGR234 em relação ao *nopJ*- e *rhcN*-.

Nas categorias apresentadas neste trabalho, foram encontrados muitos genes mais expressos em NGR234 em primórdio e em nódulos. Desta forma, os resultados sugerem que os efetores do T3SS de NGR234 são reconhecidos como proteínas similares às proteínas de patógenos, o que levaria a essa menor eficiência na nodulação de *P. vulgaris*. As estirpes mutantes *nopJ*- e *rhcN*-, apresentam nodulação semelhante entre si e maior que NGR234, sugerindo que o efector NopJ pode estar sendo reconhecido como um efector de patógeno, o que desencadearia uma nodulação menos eficiente quando T3SS está ativo. Os resultados obtidos neste trabalho, fornecem genes candidatos a serem estudados para compreender o processo de reconhecimento entre *P. vulgaris* e *S. fredii* NGR234, já que alguns deles estão envolvidos na resposta de defesa. A compreensão das vias que estão envolvidas no reconhecimento planta-bactéria, ainda não foi totalmente elucidada sendo necessário análises mais detalhadas de cada etapa do processo de interação.

7 CONCLUSÕES

- Um total de 16 bibliotecas de RNAseq obtidas de primórdios e nódulos de *P. vulgaris* inoculado com estirpe selvagem de *S.fredii* NGR234 e mutantes *nopJ*-, *nopM*- e *rhcN*-; As amostras de primórdio geraram 111.522.477 leituras e as de nódulos 29.101.836; Cerca de 58% dos reads de primórdios e 55% dos reads de nódulos mapearam em uma única região do genoma de *P. vulgaris*.
- A análise do transcriptoma de *P. vulgaris* inoculado com as estirpes selvagem NGR234 e mutantes *nopJ*- e *rhcN*- resultou em 1860 genes diferencialmente expressos, sendo 933 mais expressos em primórdios de nódulo e 927 em nódulos.
- Seis genes foram selecionados para serem validados por RT-qPCR, 16 comparações entre as estirpes selvagem *S.fredii* NGR234 e mutantes *nopJ*- e *rhcN*- em primórdios de nódulo e nódulos foram realizadas e apenas 3 destas não concordaram com os valores de *fold change* encontrados no RNAseq.
- Os genes diferenciais categorizados pelo programa Mapman, pertencem a grupos funcionais como genes PR, relacionado à resposta de defesa, síntese de hormônios e domínios de fatores transcricionais que estão presentes na reconhecimento e manutenção da simbiose.
- Muitos genes diferenciais categorizados como proteínas PR estavam mais expressos em *P. vulgaris* inoculado com estirpe selvagem NGR234. Sugerindo que as proteínas efetoras secretadas pelo T3SS podem ser reconhecidas como efetores patogênicos, levando a uma resposta de defesa e a uma menor eficiência de nodulação.
- Genes que codificam enzimas LOX estão mais expressos em *P. vulgaris* inoculado com estirpe selvagem, em primórdio e nódulos quando comparação a *rhcN*-, sugerindo que a resposta de defesa é desencadeada pela presença dos Nops do sistema de secreção tipo III.
- Genes que codificam para proteínas com domínios DUF26 (domain unknown function), LRR (leucine rich repeat), MYB, bZIP (basic leucine zipper) e AP2/ERF (APETALA2/Ethylene Response Element binding Factors) foram identificados como

diferencialmente expressos, e alguns deles atuam na resposta de defesa e manutenção da simbiose.

- As comparações NGR234-P x NG234-N, *nopJ*- P x *nopJ*- N e *rhcN*- P x *rhcN*- N apresentaram 16873 genes diferencialmente expressos, sendo 6188 mais expressos em NGR234, 5413 genes mais expressos em *nopJ*- e 6188 genes mais expressos em *rhcN*-. Os genes diferenciais foram categorizados pelo programa Mapman e pertencem a grupos funcionais como fatores transcricionais, sinalização, metabolismo secundário, proteínas PR, stress abiótico, parede celular entre outras.
- NGR234 apresenta menor eficiência de nodulação quando comparado às estirpes *nopJ*- e *rhcN*- inoculadas em *P. vulgaris*. Os efetores secretados pelo T3SS de NGR234 provavelmente são reconhecidos como proteínas efetoras de virulência, levando à resposta de defesa do hospedeiro, gerando menor número de nódulos na raiz. Desta forma, NGR234 apresenta efeito negativo na nodulação de *P. vulgaris*.

8 REFERÊNCIAS

ACOSTA, I.F. et al. Tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. **Science**. 2009 Jan 9;323(5911):262-5. 2009.

AGUILAR, M.O.; RIVA, O.; PERLTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **PNAS**. 37: 13548-13553. 2004.

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. **Elsevier Academic Press**. ed.5, 922p. 2004.

ALMAGRO, L.; GOMEZ, L.V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO A.; PEDRENO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **J Exp Bot**. 60(2):377-90. 2009.

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

ARIGONI, F et al. Nucleotide sequence of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the *fixB* product with eukaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. **Molecular & General Genetics**. v.225, p. 514–520. 1991.

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

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

BARSTEV, A.; BOUKLI, N.M.; DEAKIN, J.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. **FEBS Letters**, v.554,p. 271-274, 2003.

BELLATO, C.; KRISHNAN, H.B. ; CUBO, T.; TEMPRANO, F.; PUEPPKE, S.G. The soybean cultivar specificity gene *noIX* is present, expressed in a *nodD*-dependent manner, and of symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of *Rhizobium (Sinorhizobium) fredii*. **Microbiology**, v.143, p. 1381-1388. 1997.

BERINGER, J.E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J Gen Microbiol** 84: 188–198. 1974.

BERRABAH, F. et al. Growth conditions determine the DNF2 requirement for symbiosis. **PLoS ONE**. 2014.

BINDSCHEDLER, L.V., DEWDNEY, J., BLEE, K.A., STONE, J.M. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. **Plant J.** 47(6):851-63. 2006.

BLAIR, M.W.; IZQUIERDO, P.; ASTUDILLO, C.; GRUSAK, M.A. A legume biofortification quandary: variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. **Frontier in Plant Science**. v.4, 2013.

BOHLOOL, .B.B.; LADHA, J.K.; GARRID, D.P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil** 141(1-2):1-11. 1992.

BOHM, H., ALBERT, I.; FAN, L.; REINHARD, A.; NURNBERGER, T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. **Curr. Opin. Plant Biol.** 20C, 47–54. 2014

BOLTON, M.D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Mol. Plant Microbe Interact.** 22, 487–497. 2009.

BONARDI, V. et al. Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. **PNAS**. v.39, p.16463-16468. 2011.

BRECHENMACHER, L.; KIM, M.Y.; BENITEZ, M.; LI, M; JOSHI, T.; CALLA, B.; LIBAULT, M. Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol Plant Microbe Interact.** V.21,p. 631–645. 2008.

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

BROUGHTON, W.J., WONG, C.H., LEWIN, A., SAMREY, U., MYINT, H., MEYER, A.H., et al. Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. **J Cell Biol** 102: 1173–1182. 1986.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.D.; PERRET, X. Keys to Symbiotic Harmony. **Journal of Bacteriology**. V. 182, p. 5641–5652. 2000.

BROUGHTON, W. G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p: 55-128, 2003.

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

BRUNKARD, J. O. & ZAMBRYSKI, P. C. Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35, 76–83. 2017.

BUHIAN, W. P.; BENSMIHEN, S. Mini-Review: Nod Factor Regulation of Phytohormone Signaling and Homeostasis During Rhizobia-Legume Symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. Vol 9, Article 1247. 2018

CAMPOS-VEGA, R.; OOMAH, D.; LOARCA-PIÑA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H. Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. **Foods**. p. 374-392. 2013

CASTRO-GUERRERO, N.A.; ISIDRA-ARELLANO, M.; MENDOZA-COZATL, D. G.; VALDÉS-LÓPEZ, O. Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. **Front. Plant Sci.** 2016.

CHACÓN, S.M.I.; PICKERSGILL, B.; DEBOUCK, D.G. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. **Theor Appl Genet**, v.110, p: 432–444.2005.

CHAUVIN, A. et al. Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. **New Phytologist**.v.197, p.566–575. 2013.

CHEN, N.W.G. et al. Specific resistances against *Pseudomonas syringae* effectors AvrB and AvrRpm1 have evolved differently in common bean (*Phaseolus vulgaris*), soybean (*Glycine max*), and *Arabidopsis thaliana*. **New Phytol.** v.187, p.941–956.2010.

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

COCK, J.M., VANOOSTHUYSE, V., GAUDE, T. Receptor kinase signaling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. **Curr Opin Plant Biol.** 14:230–6. 2002.

COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J.L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death Differ.** 18(8): 1247–1256. 2011.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 29 out. 2019.

DAI, W.; ZENG, Y.; XIE, Z-P.; STAEHELIN, C. Symbiosis-Promoting and Deleterious Effects of NopT, a Novel Type 3 Effector of Rhizobium sp. Strain NGR234. **Journal of Bacteriology**. p. 5101–5110. 2008.

DEAKIN, W.J.; MARIE, C.; SAAD, M.M.;KRISHNAN, H.B.; BROUGHTON,W.J. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of Rhizobium sp. Strain NGR234. **Mol Plant Microbe Interact**. v.18, p:499-507. 2005.

DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Microbiology**. v.7, p. 312-320. 2009.

DELGADO, M.J.; BEDMAR, E. J.; DOWNIE, J.A. Genes Involved in the Formation and Assembly of Rhizobial Cytochromes and their Role in Symbiotic Nitrogen Fixation. Elsevier. v.40, p. 191-231. 1998.

DIEPOLD, A., WAGNER, S. Assembly of the bacterial type III secretion machinery. **FEMS Microbiol Rev**.38:802-22. . 2014.

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

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of nitrogen fixation. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 621–631, 1994.

D'HAENZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**. 12(6):79-105. 2002.

DÖBEREINER, J. Recente changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência & Cultura**, v.44, p. 310-3, 1992.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária O feijão-comum no Brasil : passado, presente e futuro disponível Disponível em <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 29 out. 2019.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. **Gen Appl Plant Physiol** 31:105-124. 2005

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

EHRHARDT, D. W.; WAIS, R.; LONG, S.R. Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to Rhizobium Nodulation Signals. v.85, ed.5, p.673-681. 1996.

FAO- Food and Agriculture Organization of United Nations. PHASEOLUS BEANS: Post-harvest Operations. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 29 out. 2019.

FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**. 18, 265–276. 1999.

FERNANDES, C. F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa**. ed. 21, p. 632.96. 2009

FERGUSON, B.J., MATHESIUS, U. Signalling Interactions During Nodule Development. **Journal of Plant Growth Regulation** 22:47-72. 2003.

FEUSSNER, I., WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annu Rev Plant Biol**. 2002; 53:275-97. 2002.

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.

FOLEY, J. A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**.337-342. 2011.

FRANCO, A.A.; & DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopatology**, v.20, p: 68- 74. 1994.

FRAYSSE, N.; JABBOURI, S.; TREILHOU, M.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides. **Glycobiology**. 12(11):741-8. 2002.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. **Nature** v.387, p. 394–401.1997.

GALÁN, J.E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**. v.284, ed.5418, p.1322-8. 1999.

GALIBERT, F. et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**. Ed. 27. v.293. p.668-72. 2001.

GE, Y-Y., XIANG, Q-W., WAGNER, C., ZHANG, D., XIE, Z-P., STAEHELIN, C. 2016. The type 3 effector NopL of *Sinorhizobium* sp. strain NGR234 is a mitogen-activated protein kinase substrate. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 67, No. 8 pp. 2483–2494.

GEFFROY, V.; SEVIGNAC, M.; OLIVEIRA, J.C.F.; FOUILLOUX, G. et al. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-

localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:287–296. 2000.

GEPTS, P, DEBOUCK, D.G. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) In: **van Schoonhoven A, Voysest O, editors.** Common Beans: Research for Crop Improvement.p: 7–53. 1991.

GIBSON, K.E.; KOBAYASHI, H.; WALKER, G.C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet*, v .42, p: 413–441. 2008.

GONG, H., ZHU , X. , CHEN, K., WANG, S., ZHANG, C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science* 169. 313–321. 2005.

GONZALEZ, E.M.; APARICIO-TEJO, P.M.; GORDON, A.J.; MINCHIN, F.R.; ROYUELA, M., ARRESE-IGOR, C. Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. exp. Biol.* v.49, p. 1705-1714, 1998.

GÖTTFERT, M.; RÖTHLISBERGER, S.; KÜNDIG, C.; HENNECKE, H. Potential Symbiosis-Specific Genes Uncovered by Sequencing a 410-Kilobase DNA Region of the *Bradyrhizobium japonicum* Chromosome. *Journal of Bacteriology*. v.183, ed.4, p.1405-12. 2001.

GOURION, B.; BERRABAH, F; RATET, P.; STACEY, G. Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Science*. v.20, n. 3. P. 186-194. 2015.

GUINEL, F. and GEIL, R. A Model for the Development of the Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses in Legumes and Its Use to Understand the Roles of Ethylene in the Establishment of these two Symbioses. *Canadian Journal of Botany* 80(7):695-720. 2002.

HE, S.Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T.S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694. p:181–182, 2009.

HOTSON, A.; CHOSED, R.; SHU, H.; ORTH, K.; MUDGETT, M. B.. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol . Microbiol.* 50, 377-389. 2003.

HOWE, G. A., SCHILMILLER, A.L. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5(3):230-6. 2002.

HU, Y.; FAY, A. W.; LEE, C. C.; RIBBE, M. W. P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. *PNAS* v. 104, n.25. p. 10424-10429. 2007.

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.

JAIN, D., KHURANA, J.P. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In: Singh A., Singh I. (eds) **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction.** Springer, Singapore. 2018

JONES, J. D.G.; DANGL, J. The plant immune system. **Review in Nature Microbiology.** v. 444, p. 323-329. 2006.

KACHROO, A., KACHROO, P. Fatty acid-derived signals in plant defense. **Annu. Rev. Phytopathol.** 47, 153–176. 2009.

KAMBARA, K. Regulation and effects of the type-three secretion system of "Rhizobium" species NGR234. **Thèse de doctorat** : Univ. Genève, 2008.

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

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

KAWAHARADA, Y.; KELLY, S.; NIELSEN, N.W.; HJULER, C.T.; GYSEL, K.; MUSKY, K. S.; NIELSEN, M.W.; HJULER, C.T.; GYSEL, K., MUSZYNSKI, A.; CARLSON, R.W.; THYGESEN, M.B.; SANDAL, N.; ASMUSSEN, M.H. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. **Nature**, v.523, p: 308–312. 2015.

KIM, S., ANDAYA, V. C. and TAI, T. H. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. **Biochem. J.** 435:373–380. 2011.

KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. **Eur. J. Biochem.** 269: 1067-71. 2002.

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.

KRISHNAN, H.B. NoIX 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:831-9. 2002.

KRISHNAN, H.B., LORIO, J.; KIM, W.S.; JIANG, K.; DEBOER, M.; PUEPPKE, S.G. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with piluslike 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.

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.

KERESZT, A.; MERGAERT, P.; KONDOROSI, E. Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims? **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.11, p.1300-9. 2011.

LE QUÉRÉ, A.; DEAKIN, W.J.; SCHMEISSER, C. et al. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp NGR234 - Deletion of the rkpMNO locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-non-2-ulosonic acid. **Journal of Biological Chemistry**. 281(39):28981-92. 2006.

LI, X.L.; XU, J.; YU, G.Q.; LUO, L . A wound-induced small polypeptide gene family is upregulated in soybean nodules. **Chinese Science Bulletin**. v. 58, p.1003–1009. 2013.

LIBAULT, M.; JOSHI, T.; TAKAHASHI, K.; HURLEY- SOMMER, A.; PURICELLI, K.; BLAKE, S.; STACEY, G. Large-scale analysis of putative soybean regulatory gene expression identifies a Myb gene involved in soybean nodule development. **Plant Physiol**. v.151, p.1207–1220. 2009.

LIBAULT, M. et al. Complete Transcriptome of the Soybean Root Hair Cell, a Single-Cell Model, and Its Alteration in Response to *Bradyrhizobium japonicum* Infection. **Plant Physiology**. v. 152, p. 541–552. 2010.

LIGERO, F., LLUCH, C., OLIVARES, J. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. **J. Plant Physiol**. 125:361-365. 1986.

LOBATON, J. D.; MILLER, T et al. Resequencing of Common Bean Identifies Regions of Inter-Gene Pool Introgression and Provides Comprehensive Resources for Molecular Breeding. **Plant Genome** . 11:170068. 2018.

LOHAR, D.P.; SHARAPOVA, N.; ENDRE, G.; PENUELA, S.; SAMAC, D.; TOWN, C.D.; SILVERSTEIN, K.A.T.; VANDENBOCH, K.A. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology** 140: 221–234. 2006

LOHAR, D. P. et al. Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. **Annals of Botany**. 104(2):277-85. 2009.

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: 1259-68. 2004.

LOPEZ-BAENA, F.J.; MONREAL, J.A.; PEREZ-MONTANO, F.; GUASCH-VIDAL, B.; BELLOGIN, R.A.; VINARDELL, J.M. & OLLERO, F.J. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. **Mol. Plant Microbe Interact**. v.22, p: 1445–1454. 2009.

LÓPEZ-BAENA, F.J.; RUIZ-SAINZ, J.E.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; VINARDELL, J.M. Bacterial Molecular Signals in the *Sinorhizobium fredii*-Soybean Symbiosis. **Int. J. Mol. Sci.** 17, 755.2016.

LOPEZ-GOMEZ, M et al. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 393–401, 2012

LOPEZ, M. A., VICENTE, J., KULASEKARAN S., VELLOSILO, T., MARTINEZ M. Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. **Plant J.** 67, 447–458. 2011.

LOVE, M.; HUBER, W. ; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol.** 15(12):550. 2014.

MACHO, A.P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Mol. Cell** v.54, p.263–272. 2014.

MCGONIGLE, B., KEELER, S. J., LAU S.-L. C., KOEPPE, M. K., O'KEEFE, D. P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiol.** 124, 1105–1120. 2000

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.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H.; PERRET, X.; BROUGHTON, W.J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.16, p:743-51. 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.

MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* Genome, Critical Reviews in Plant Sciences, 9:1, 59-93. 1990.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**. 252: 11–23. 2003.

MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends Microbiol.** v. 17, n. 10, p. 458-466, 2009.

MATILLA, M. A. Metabolic Responses of Plants Upon Different Plant–Pathogen Interactions. **Elsevier**. p. 195-214. 2018.

MEINHARDT, L. W.; KRISHNAN, H. B.; BALATTI, P. A.; PUEPPKE, S. G. Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USAD257. **Mol. Microbiol.** v.9, p.17-29. 1993.

MUCYN, T.S. et al. The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity. **The Plant Cell**, v. 18, p.2792–2806, 2006.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **J. Exp. Bot.** v.59, p. 501–520. 2008.

NEWMAN, M.A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J.T., ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Front. Plant Sci.** v.4. 2013.

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

NOMAN, A.; AQEEL, M.; LOU, Y. PRRs and NB-LRRs: From Signal Perception to Activation of Plant Innate Immunity. **Review in Int. Journal of Molecular Sciences.** v.20. 2019.

OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J.A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 5(7):566-76. 2004.

OLDROYD, G. E. D.; HARRISON, M. J.; UDVARDI, M. 2005. Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. **Plant Physiol.** v.137, p.1205-1210. 2005.

OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annu Rev Plant Biol.** v.59, p.519-46. 2008.

OLDROYD, G.E.; MURRAY, J.D.; POOLE, P.S.; DOWNIE, J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annu Rev Genet.** v. 45, p.119-44. 2011.

OLIVER, J.; CASTRO, A.; GAGGERO, C.; CASCO, T.; SCHMELZ, E.; CASTRESANA, C.; PONCE DE LEON, I. Pythium infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta* 230: 569–579. 2009

O'ROURKE, J. A.; INIGUEZ, L.P.; FU, F.; BUCCIARELLI, B.; MILLER, S. S.; JACKSON, S. A.; MCCLEAN, P.E.; LI, J.; DAI, X.; ZHAO, P.X. An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. **BMC Genomics.** v. 15, p. 866. 2014.

PATRIARCA, E.J.; TATE, R.; LACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄ metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 203-222, 2002.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; AND OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33: 219-226, 2009.

PERRET X., STAEHELIN C., BROUGHTON W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.64, p. 180-201, 2000.

PERRET, X. et al. Functional analysis of the *nifQdctA1y4vGHIJ* operon of *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 using a transposon with a NifA-dependent read-out promoter. **Microbiology.** v.157, p. 2745–2758. 2011.

PETRY, N.; BOY, E.; WIRTH, J.P.; HURREL, R.F. Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. **Nutrients.** p.1144-73. 2015

POSTGATE, J. Nitrogen fixation. 3rd Edition, **Cambridge UP**, Cambridge. 1998.

PONCE DE LEON, I., MONTESANO, M. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 3178–3200. 2013.

POOLE, P., RAMACHANDRAN, V., and TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nat. Rev. Microbiol.** 16, 291–303. 2018.

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.

QUEZADA, E.H.; GARCÍA, G.X.; ARTHIKALA, M.K.; MELAPPA, G.; LARA, M.; NANJAREDDY, K. Cysteine-Rich Receptor-Like Kinase Gene Family Identification in the Phaseolus Genome and Comparative Analysis of Their Expression Profiles Specific to Mycorrhizal and Rhizobial Symbiosis. **Genes**, 10, 59. 2019.

REIS, V.M.; PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, G. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.v. 56, p.1931–1937. 2006.

REUHS, B.L.; CARLSON, R.W.; KIM, J.S. Rhizobium fredii and Rhizobium meliloti produce 3-deoxy-D-ribose-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group K antigens (capsular polysaccharides) found in Escherichia coli. **J. Bacteriol.**, 175, 3570-3580. 1993.

REUHS, B.; RELIC, B.; FORSBERG, L.S.; BROUGHTON, W.J. Structural Characterization of a Flavonoid-Inducible *Pseudomonas aeruginosa* A-Band-Like O Antigen of Rhizobium sp. Strain NGR234, Required for the Formation of Nitrogen-Fixing Nodules. *Journal of Bacteriology*. v. 187, ed.18, p.6479-87. 2005.

RIOS, A. O.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A. D. Effect of storage and harvest conditions on some physical, chemical and nutritive properties of three bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Food Science and Technology**. v.23. p. 39-45. 2003.

ROBSON, R.L.; POSTGATE, J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Annual Review Microbiology**. v. 34, p.183–207. 1980.

RODRIGUES, J.A.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; VINARDELL, J.; ESPUNY, M. R.; RUIZ-SAINZ, J.; THOMAS, M.R.; SUMPTON, D.; AULT, J.; TOMAS-OATES, J. NopM and NopD Are Rhizobial Nodulation Outer Proteins: Identification Using LC-MALDI and LC-ESI with a Monolithic Capillary Column. **Journal of Proteome Research**, v.6, p.1029-1037. 2007.

RUBIO, L.M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review Microbiology**. v.62. p.93-111. 2008.

SAAD, M.M.; KOBAYASHI, H.; MARIE, C; BROWN, I.R.; MANSFIELD, J.W, BROUGHTON, W.J.; DEAKIN, W.J. NopB, a type III secreted protein of Rhizobium sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p:1173-81. 2005.

SALVADOR, C.A. Análise conjuntura agropecuária sabra 2010/2011. Disponível no site: http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2010_11.pdf
Acesso em 22 de setembro de 2018.

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, 2009.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A.; CANNON, S.B.; GRIMWOOD J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nat. Genet.** 46(7):707–713. 2014

SHIU, S.H., BLEEKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proc Natl Acad Sci.** 98:10763–68. 2001.

SONG, H.; PENGFEI, W.; JER-YOUNG, L. et al. Genome-Wide Identification and Characterization of WRKY Gene Family in Peanut. **Front. Plant Sci.** v.7, 534 . 2016.

SOTO, M.J. et al. Mutualism versus pathogenesis: The give-and-take in plant-bacteria interactions. **Cellular Microbiology** v.3,381-8.2009.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annu Rev Microbiol.** v.54, p.257-88.2000.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen Fixing Organisms, Pure and Applied Aspects. London: **Chapman and Hall.** 8rd Edition. 256 pp. 1990.

SKORPILI, P.; SAAD, M.M.; BOUKLI, N.M.; KOBAYASHI, H.; ARES-ORPEL, F., BROUGHTON, W.J.; DEAKIN, W.J. NopP, a phosphorylated effector of Rhizobium sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. **Molecular Microbiology**, v.57, p:1304-17. 2005.

STAEHELIN, C.; KRISHNAN, B. H. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. **Biochem. J.** v. 470, p.263–274. 2015.

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

STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. **J.Exp. Bot.** 51: 1531-1542. 2000.

STREIT, W. R.;SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN,W.J.; RAASCH, C.; LIESEGANG, BROUGHTON, W. J. An evolutionary hot spot: The pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology** .186(2):535-42. 2004.

THOMPSON, M.D.; MENSACK, M.M.; JIANG, W.; ZHU, Z.; LEWIS, M.R.; MCGINLEY, J.N.; BRICK, M.A.; THOMPSON, H.J. Cell signaling pathways associated with a reduction in mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Carcinogenesis**. v.33, p. 226–232. 2012.

TRABANCO, N.; CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Identification of a new chromosomal region involved in the genetic control of resistance to anthracnose in common bean. **The Plant Genome**, v.8, n.2, p.1-11, 2015.

TOR, M.; LOTZE, M.T.; HOLTON, N. Receptor-mediated signalling in plants: Molecular patterns and programmes. **J. Exp. Bot.** 60, 3645–3654. 2009.

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 Applied Bacteriology**, v. 49, p. 39-53. 1980.

UDVARDI, M.; POOLE, P.S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annu Rev Plant Biol.** v. 64, p. 781-805. 2013.

URBANEK, H. et al. Induction of Glutathione S-Transferase and Lutathione by Toxic Compounds and Elicitors in Reed Canary Grass. **Biotechnology Letters** 27(13):911-4. 2005.

VALDÉS- LÓPEZ, O.; HERNÁNDEZ, G. Early Responses in the Root-Rhizobia Interaction. **Advances in Botanical Research**. v.75. 2015.

VAATTOVAARA, A., SALOJARVI, J. & WRZACZEK, M. Extraction and curation of gene models for plant receptor kinases for phylogenetic analysis. **Methods Mol. Biol.** 1621, 79–91. 2017.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 2002.

VELASQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v.72, p: 427-436. 1988.

VELLOSILLO, T., MARTINEZ, M., LOPEZ, M. A., VICENTE J., CASCON, T., DOLAN, L. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root

development and defense responses through a specific signaling cascade. **Plant Cell** 19, 831–84. 2007.

VIPREY, V.; GRECO, A. D.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.; PERRET, X. Symbiotic implication of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v.28, n.6, p.1381-1389, 1998.

VLASOVA, A.; CAPELLA-GUTIERREZ, S.; RENDON-ANAYA, M.; HERNANDEZ-OÑATE, M.; MINOCHE, A. E. ERB, I. et al. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. **Genome Biol.** 17:32. 2016

XIN, D.W.; LIAO, S.; XIE, Z.; HANN, D.R.; STEINLE, L.; BOLLER, T.; STAEHELIN, C. Functional Analysis of NopM, a Novel E3 Ubiquitin Ligase (NEL) Domain Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **PLoS Pathog.** v.8, e1002707. 2012.

XU, C-C.; ZHANG, D.; HANN, D.R. ; XIE, Z-P. ; STAEHELIN, C. 2018. Biochemical properties and in planta effects of NopM, a rhizobial E3 ubiquitin ligase. **Journal of biological chemistry.** 293, 15304-15315.

YAMAGUICHI, C. Processo biotecnológico para a produção de feijão desidratado com baixo teor de oligossacarídeos da família rafinose. **Dissertação de Mestrado.** UFPR, 2008.

WANI, S. H.; SINGH, N. B.; DEVI, T. R.; HARIBHUSHAN, A.; JEBERSON, S. M.; MALIK, C. P. et al. Engineering abiotic stress tolerance in plants: extricating regulatory gene complex, In *Conventional and Non-Conventional Interventions in Crop Improvement*, eds **Malik C. P., Sanghera G. S., Wani S. H., editors.** (New Delhi: CABI), 1–19. 2013.

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

WASTERACK, C., HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Ann. Bot.** 111, 1021–1058. 2013.

XIN, D. ; LIAO, S. ; XIE, Z. ; HANN, D. R. ; STEINLE, L. ; BOLLER, T. ; STAEHELIN, C. Functional Analysis of NopM, a Novel E3 Ubiquitin Ligase (NEL) Domain Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **PLoS Pathog** 8(5): e1002707. 2012.

XU, C-C.; ZHANG, D.; HANN, D.R. ; XIE, Z-P. ; STAEHELIN, C. Biochemical properties and in planta effects of NopM, a rhizobial E3 ubiquitin ligase. **Journal of biological chemistry.** 293, 15304-15315. 2018.

ZHANG, L.; CHEN, X.J.; LU, H.B.; XIE, Z.P.; STAEHELIN, C. Functional analysis of the type 3 effector NopL from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation and interference with MAPK signaling. **Journal of Biological Chemistry**. v.37, p: 32178-3287, 2011.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J.D.G., BOLLER, T., FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell** 125, 749–760. 2006.

APÊNDICE

Análise de genes diferencialmente expressos envolvendo o mutante *nopM* de *S. fredii* NGR234

As bibliotecas de primórdios e nódulos inoculados com a estirpe mutante *nopM*- de NGR234 foram discrepantes em relação as outras bibliotecas obtidas. Nas comparações dos genes mapeados desta biblioteca com as outras condições testadas, *nopM*-apresentou um número muito maior de genes diferencialmente expressos (Figura A1).

Na análise de RT-qPCR, um grande número de comparações que incluíam *nopM*- não concordaram com os valores obtidos no RNAseq. De 24 comparações avaliadas por RT-qPCR, 12 resultaram em valores de *fold change* opostos aos observados no RNAseq. Desta forma, estes dados foram retirados das análises e do manuscrito para publicação.

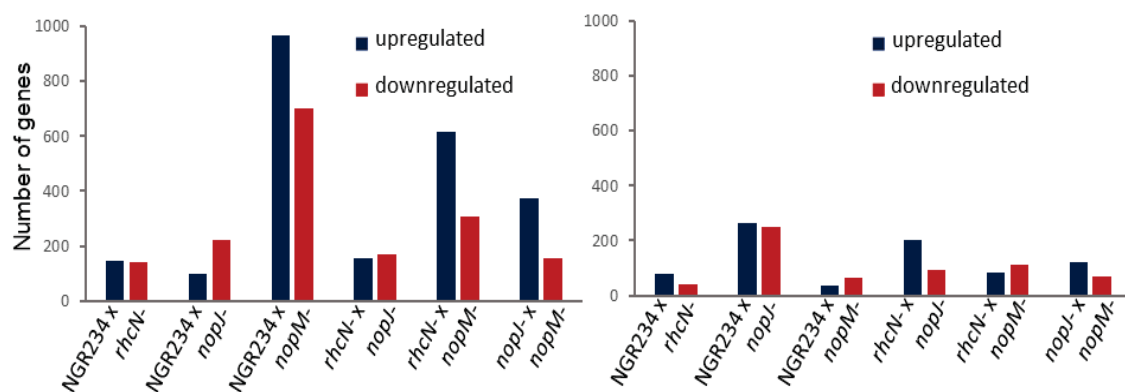


Figura A1. Gráfico das comparações em primórdio e nódulo de *P. vulgaris* inoculado com estirpe selvagem NGR234 e mutantes *nopM*-, *nopJ*- e *rhcN*-.