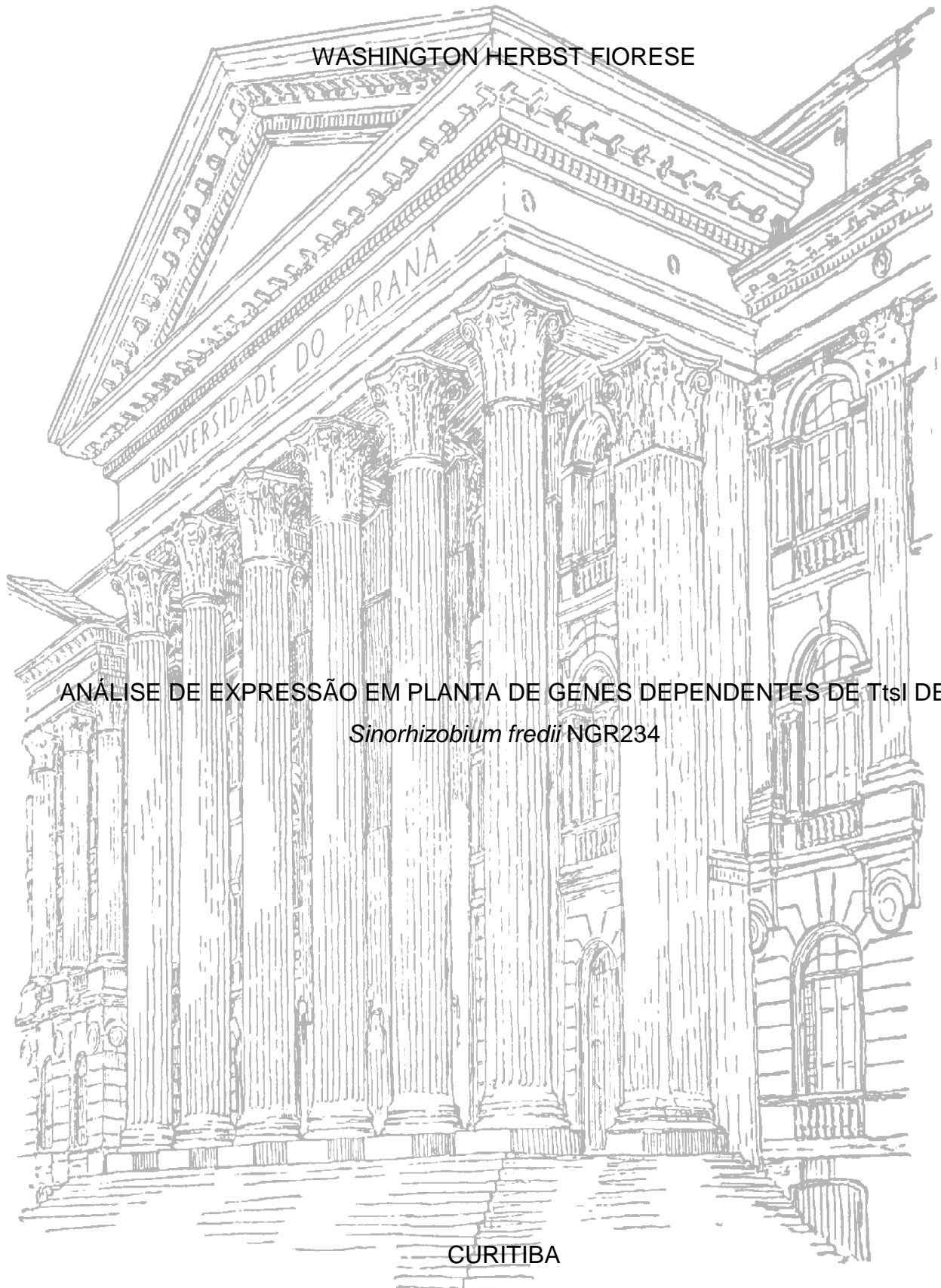


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WASHINGTON HERBST FIORESE



ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM PLANTA DE GENES DEPENDENTES DE TtsI DE
Sinorhizobium fredii NGR234

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WASHINGTON HERBST FIORESE

ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM PLANTA DE GENES DEPENDENTES DE TtsI DE
Sinorhizobium fredii NGR234

Monografia apresentada como requisito à disciplina BIO028 – Estágio Supervisionado em Biologia, modalidade Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Roseli Wassem

CURITIBA

2016

RESUMO

Sinorhizobium fredii NGR234 é um microrganismo fixador de nitrogênio, capaz de reconhecer flavonóides liberados por diversas plantas. Após o reconhecimento se estabelecem relações simbióticas entre planta e bactéria, culminando na formação de nódulos radiculares fixadores de nitrogênio. O Sistema de Secreção Tipo III (TTSS ou T3SS) é um dos fatores que afetam a formação dos nódulos simbióticos em linhagens de rizóbios. TTSS é um importante fator de virulência em bactérias Gram-negativas, pois permitem que proteínas efetoras bacterianas sejam translocadas para dentro do citoplasma das células do hospedeiro, onde modulam diversas funções biológicas, como expressão gênica, progressão do ciclo celular e funções bioquímicas. Em NGR234 estas proteínas efetoras são expressas em resposta a uma cascata regulatória controlada por flavonóides. A transcrição dos genes codificadores é ativada diretamente pelo regulador TtsI que reconhece os alvos por se ligar a *tts-boxes* (sendo onze no total). Este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil de expressão de genes *tts* *in vivo*, durante todo o processo de nodulação. Para tanto, foram analisados seis *tss-boxes* (TB1, TB4, TB6, TB8, TB9 e TB11) fusionados ao gene *gfp* sem promotor e os níveis de expressão de GFP foram acompanhados no desenvolvimento de nódulos nas plantas *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* infectadas com NGR234. Verificou-se que a expressão de GFP ocorreu em todas as fases de desenvolvimento do nódulo, desde o início da infecção da planta pela bactéria. Os *tts-boxes* mais expressos em *Vigna unguiculata* foram: TB6, TB8, TB1, TB11, TB9 e TB4, respectivamente, enquanto em *Phaseolus vulgaris* foram: TB8, TB9, TB6, TB11, TB1 e TB4, respectivamente.

Palavras-chave: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *tts-box*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

Sinorhizobium fredii NGR234 is a microorganism that is able to fix nitrogen, capable of recognizing flavonoids released by many plants. After recognition symbiotic relationships are established between plant and bacteria, resulting in the formation of nitrogen fixing root nodules. The type III secretion system (TTSS or T3SS) is one of the factors that affect the development of symbiotic nodules in rhizobia strains. TTSS is an important virulence factor in Gram-negative bacteria because they enable bacterial effector proteins to be translocated into the cytoplasm of host cells, where they modulate various biological functions, such as gene expression, cell cycle progression and biochemical functions. In NGR234 these effector proteins are expressed in response to a regulatory cascade controlled by flavonoids. The transcriptional activation of encoding genes is made directly by the regulator TtsI, which recognizes the targets by binding to *tts-boxes* (eleven in total). This study aimed to evaluate the expression profile of *tts* genes *in vivo* throughout the nodulation process. To do that, six *tts-boxes* (TB1, TB4, TB6, TB8, TB9 and TB11) fused to *gfp* gene without promoter were analyzed and GFP expression levels were followed in the developing nodules of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*, infected with NGR234. GFP expression was observed in all stages, from the beginning of the infection by bacteria to mature nodules. The most expressed *tts-boxes* in *Vigna unguiculata* were: TB6, TB8, TB1, TB11, TB9 and TB4, respectively, while in *Phaseolus vulgaris* were TB8, TB9, TB6, TB11, TB1 and TB4, respectively.

Key-words: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *tts-box*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III.	12
FIGURA 2 - PROCESSO DE NODULAÇÃO POR RIZÓBIO.....	14
FIGURA 3 - MODELO DE INTERAÇÃO ENTRE <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 E LEGUMINOSA.....	16
FIGURA 4 – MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.	17
FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DAS FASES DE LEITURA ABERTAS CONTROLADAS POR <i>tts-boxes</i>	18
FIGURA 6 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES CONTENDO <i>tts-boxes</i> EM pNGR234a.	19
FIGURA 7 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-NB8).....	30
FIGURA 8 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB1).	31
FIGURA 9 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB4).	32
FIGURA 10 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB6).	33
FIGURA 11 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB8).	34
FIGURA 12 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT'-TB9).	35
FIGURA 13 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Vigna unguiculata</i> INFECTADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT'-TB11).	36
FIGURA 14 – INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM <i>Vigna unguiculata</i> COLONIZADA POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 CONTENDO AS FUSÕES INDICADAS.	37
FIGURA 15 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-NB8).	39
FIGURA 16 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB1).....	40
FIGURA 17 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB4).....	41
FIGURA 18 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB6).....	42
FIGURA 19 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT-TB8).....	43
FIGURA 20 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT'-TB9).	44
FIGURA 21 - CORTES TECIDUAIS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INFECTADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 (pGT'-TB11).	45
FIGURA 22 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM <i>Phaseolus vulgaris</i> COLONIZADO POR <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 CONTENDO AS FUSÕES INDICADAS.	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Sinorhizobium</i> UTILIZADAS.....	21
TABELA 2 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	21
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO PARA RIZÓBIO (RMS).....	22
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO B&D.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	10
2.2	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	11
2.3	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	13
3	OBJETIVO	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	ESTRATÉGIA GERAL ADOTADA.....	20
4.2	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	21
4.3	MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	22
4.4	ANTIBIÓTICOS.....	23
4.5	CONJUGAÇÃO BACTERIANA E SELEÇÃO	23
4.6	CULTIVO DE PLANTAS.....	24
4.6.1	PREPARO DE SUBSTRATO PARA CULTIVO DE PLANTAS	24
4.6.2	PREPARO DE POTES DE CULTIVO DE PLANTAS	24
4.6.3	DESINFECÇÃO DE SEMENTES	24
4.6.4	GERMINAÇÃO DE SEMENTES	25
4.6.5	TRANSFERÊNCIA DE SEMENTES PARA POTES DE CULTIVO.....	25
4.6.6	PREPARO DE INÓCULOS.....	25
4.7	PREPARO DE LÂMINAS E MICROSCOPIA.....	26
4.8	CÁLCULO DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA.....	27
5	RESULTADOS	27
5.1	ANÁLISE GERAL POR MICROSCOPIA	27
5.1.1	ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM <i>Vigna unguiculata</i>	28
5.1.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM <i>Phaseolus vulgaris</i>	38
6	DISCUSSÃO	46

7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio são aquelas que possuem a capacidade de assimilar nitrogênio atmosférico em sua forma gasosa e incorporá-lo à matéria orgânica. Essas bactérias são denominadas diazotróficas, podendo ser de vida livre, associativas ou ainda simbióticas. Esta última categoria apresenta os melhores resultados quanto à fixação biológica de nitrogênio, principalmente pelo fato de terem desenvolvido a capacidade de invadir e se multiplicar dentro de plantas hospedeiras formando estruturas diferenciadas nas raízes das plantas, chamadas de nódulos. A bactéria *Sinorhizobium fredii* NGR234 é utilizada como organismo modelo nos estudos do processo de nodulação, pois possui a capacidade de nodular 112 diferentes gêneros de legumes. De forma geral, bactérias que possuem a capacidade de invadir e nodular plantas são chamadas de rizóbios.

Para o estabelecimento da simbiose e nodulação da planta pela bactéria são necessárias trocas de sinais moleculares coordenados e integrados entre ambos. Plantas naturalmente produzem e secretam no solo compostos fenólicos, denominados flavonóides. Quando estes compostos são reconhecidos e assimilados pelas bactérias, uma série de reações ocorre nos microrganismos, desencadeando a ativação de genes *nod*, que são relacionados à nodulação. A bactéria então produz e secreta fatores Nod no solo que, uma vez reconhecidos e aceitos pela planta, desencadearão o processo de infecção culminando no surgimento de nódulos em suas raízes.

A infecção ocorre inicialmente com o processo de curvatura do pelo radicular, onde inúmeras bactérias são englobadas e, devido aos fatores Nod, as células da planta passam a diferenciar-se gerando um cordão de infecção que se estende do pelo radicular até a região das células corticais da raiz. As bactérias então migram e se alojam nas células corticais da planta, crescem e se diferenciam em bacteroides (formas fixadoras de nitrogênio). Durante a colonização e diferenciação das bactérias ocorre uma intensa divisão celular da raiz que posteriormente irá se tornar o nódulo.

Infecção de legumes por *S. fredii* NGR234 e posterior desenvolvimento de nódulos fixadores de nitrogênio são dependentes das ações coordenadas de fatores Nod, proteínas secretadas por um Sistema de Secreção tipo III (T3SS ou TTSS), e também de modificações de polissacarídeos da superfície bacteriana. A produção

destas moléculas sinalizadoras é dependente de flavonóides da planta que desencadeiam uma cascata de regulação controlada pelos ativadores da transcrição NodD1, NodD2, SyrM2 e TtsI. TtsI é conhecido por controlar os genes responsáveis pela função do T3SS e síntese de um lipopolissacarídeo rico em ramnose, provavelmente por meio da ligação a elementos *cis* denominados *tts-box* (TB). Onze *tts-boxes* (TB1 a TB11) foram identificados em regiões promotoras dos genes alvo no plasmídeo simbiótico de NGR234 (pNGR234a). Dentre os *tts-boxes* há seis que estão localizados em genes/operons envolvidos na montagem da máquina de secreção do tipo III ou na produção de proteínas externas de nodulação (Nops), são eles: TB1, TB4, TB6, TB 8, TB9 e TB11, sendo estes o alvo de estudos deste trabalho.

T3SS é o responsável pela secreção de um conjunto de proteínas efetoras, que afetam a comunicação entre bactéria e planta. Por meio desse sistema, as proteínas efetoras produzidas pela bactéria são translocadas de seu citoplasma diretamente para o citoplasma da planta hospedeira.

Como ainda não se sabe com exatidão em qual fase do processo de infecção estes genes são expressos e como se comportam, este trabalho tem por objetivo induzir o processo de infecção das plantas *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* por *S. fredii* NGR234 e acompanhar a expressão de alguns dos genes contendo *tts-boxes*. As regiões regulatórias destes genes estão clonadas em vetores, controlando a expressão de proteína fluorescente verde (GFP), através de microscopia de fluorescência cortes de tecidos da planta foram analisados em diferentes estágios do desenvolvimento (pelos radiculares, primórdios de nódulos e nódulos maduros) a fim de descobrir o padrão de expressão destes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é uma molécula de importância fundamental para o metabolismo de todos os seres vivos, pois é componente de diversas biomoléculas. As plantas, produtores primários na cadeia alimentar, precisam absorver nitrogênio por meio de suas raízes, contudo, este é pouco abundante nos solos. Esta baixa disponibilidade de nitrogênio para as plantas tem sido o fator limitante na

produtividade agrícola, que é minimizado com o uso de fertilizantes nitrogenados. Tanto a produção quanto a utilização de fertilizantes nitrogenados químicos são altamente dispendiosos, além de poluentes (JU *et al.*, 2009). O gás nitrogênio está presente na atmosfera terrestre sob a forma de dinitrogênio (N₂), perfazendo 78% de sua composição. Porém, este é um gás inerte que necessita ser combinado com outros elementos, como o hidrogênio, para ser absorvido pelos seres vivos. Os fertilizantes nitrogenados se perdem facilmente, em função de diversos processos, como a lixiviação, volatilização e desnitrificação. Devido a estas perdas, o manejo adequado tem como propósito maximizar a eficiência do seu uso. Para tanto, tem-se buscado reduzir sua perda no solo e melhorar sua absorção pelas plantas (SALGADO *et al.*, 2012). Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e a translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento de folhas e raízes (RYLE *et al.*, 1979).

Rhizobium, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente rizóbios) são gêneros de microrganismos capazes de fixar nitrogênio por meio do estabelecimento de relações simbióticas com plantas da família Fabaceae (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999). A este processo de fixar o N₂ e disponibilizá-lo para a planta na forma de amônio (NH₄⁺), é dado o nome de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Bactérias que possuem esta capacidade são denominadas diazotróficas.

2.2 *Sinorhizobium fredii* NGR234

Sinorhizobium fredii NGR234 é uma alfa-proteobactéria Gram-negativa única (ordem Rhizobiales), pois forma nódulos fixadores de nitrogênio com mais legumes do que qualquer outro microssimbionte sendo a estirpe de mais ampla faixa de hospedeiros entre os rizóbios, podendo nodular mais de 112 gêneros de legumes (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

Seu genoma possui 6,9 - Mpb e está dividido em três replicons: um cromossomo de 3,93 - Mpb (cNGR234) que codifica a maioria das funções necessárias para o crescimento celular; um megaplasmídeo de 2,43 - Mpb (pNGR234b) responsável por algumas funções essenciais para a bactéria e um plasmídeo simbiótico de 0,54 - Mpb (pNGR234a) que contém todos os genes necessários para a síntese de fatores Nod (NF) e fixação de nitrogênio. Este

microrganismo é capaz de codificar diferentes tipos de sistemas de secreção, mais que qualquer outro rizóbio conhecido e, provavelmente, mais que qualquer outra bactéria. Ao todo, 132 genes e proteínas estão ligados aos processos de secreção. NGR234 também possui genes e redes reguladoras envolvidas com o metabolismo de uma vasta gama de compostos aromáticos e não aromáticos. Desta forma, NGR234 pode se adaptar rapidamente às mudanças e estímulos ambientais nos solos, rizosfera e plantas (SCHMEISSER *et al.*, 2009).

O sequenciamento do plasmídeo simbiótico mostrou que ele contém ortólogos de um sistema de secreção de proteínas do tipo III. Até então, pensava-se que este sistema de secreção fosse característico de bactérias patogênicas onde desempenhavam um papel importante na infecção do hospedeiro. T3SS (FIGURA 1) forma um aparelho que injeta proteínas bacterianas diretamente em células eucarióticas, interrompendo o funcionamento normal da célula e facilitando a infecção. Este aparelho faz com que a passagem destas proteínas seja possível entre o citoplasma da bactéria e o citoplasma das células da planta. O T3SS de NGR234 é capaz de secretar Nops, e é um importante determinante da gama de hospedeiros (MARIE *et al.*, 2003).

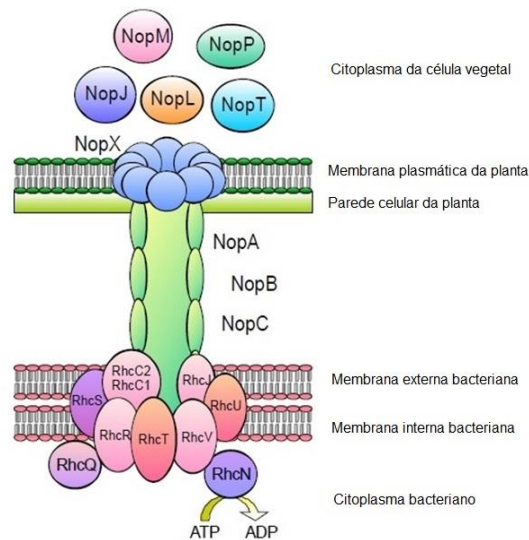


FIGURA 1 - MODELO DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III.

NOTA: Maquinaria do T3SS exibindo a agulha de infecção formada pela bactéria que ligará seu citoplasma ao citoplasma da planta atravessando parede celular e membrana plasmática da célula vegetal. São exibidas ainda as Nops produzidas pela bactéria, alguma são translocadas para a planta enquanto outras possuem função estrutural atuando na formação da agulha.

FONTE: Adaptado de Kambara, 2008.

2.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A interação entre as linhagens de microrganismos e as espécies vegetais é bastante específica, mas varia desde rizóbios com uma pequena faixa de legumes hospedeiros até rizóbios com uma ampla faixa, como é o caso de *S. fredii* NGR234. Para que a colonização ocorra é necessário o reconhecimento entre ambos os parceiros da simbiose. O gatilho para o início da interação é o reconhecimento e aceitação, pela bactéria, de flavonóides secretados pela planta. Em resposta, a bactéria secreta fatores Nod, que também deverão ser reconhecidos e aceitos pela planta hospedeira para que a interação aconteça.

Embora muitos rizóbios e plantas hospedeiras possuam a capacidade de entrar em simbiose com mais de um parceiro, apenas certas combinações de simbiontes resultam na formação de nódulos fixadores de N. Associações ineficazes geram nódulos contendo bacteroides incapazes de realizar a fixação. A especificidade entre os parceiros minimiza as chances de infecção por patógenos e formação de associações ineficazes que são prejudiciais para planta e microrganismo. Durante as fases iniciais de nodulação estes códigos são dados por flavonóides e fatores Nod. (PERRET *et al.*, 2000).

Para o processo de formação do nódulo (FIGURA 2), rizóbios livres no solo devem se mover em direção à superfície da raiz para que ocorra sua entrada no tecido radicular interno, onde irão preencher as células do nódulo. O resultado da primeira troca de sinais moleculares entre planta e bactéria resulta na atração do rizóbio em direção aos pelos radiculares (PERRET *et al.*, 2000). Esta atração é iniciada pelo reconhecimento dos flavonóides liberados pela planta e em resposta ocorre a produção e liberação de fatores Nod.

O contato com rizóbio, pela ação de fatores Nod, perturba ativamente o processo de crescimento celular do pelo radicular, que passa a crescer assimetricamente, o que faz com que ele se deforme e sofra uma curvatura. Por meio da liberação de enzimas pela bactéria ocorre a degradação da parede celular vegetal acarretando no desenvolvimento do cordão de infecção (PERRET *et al.*, 2000; RIDGE, 1985), um canal que se estende do ápice do pelo radicular às células corticais da raiz, por meio dele ocorrerá a invasão da célula vegetal pelo microrganismo. A bactéria induzirá a formação de um órgão, conhecido como nódulo, nas as raízes das plantas. Os nódulos são colonizados por bactérias que se

diferenciam em novo tipo celular denominado bacteroide, que é a forma capaz de realizar a fixação biológica de nitrogênio. O nitrogênio, em sua forma utilizável, é fornecido à planta em troca de nutrientes (OKE, 1999) estabelecendo assim a relação simbiótica entre os envolvidos.

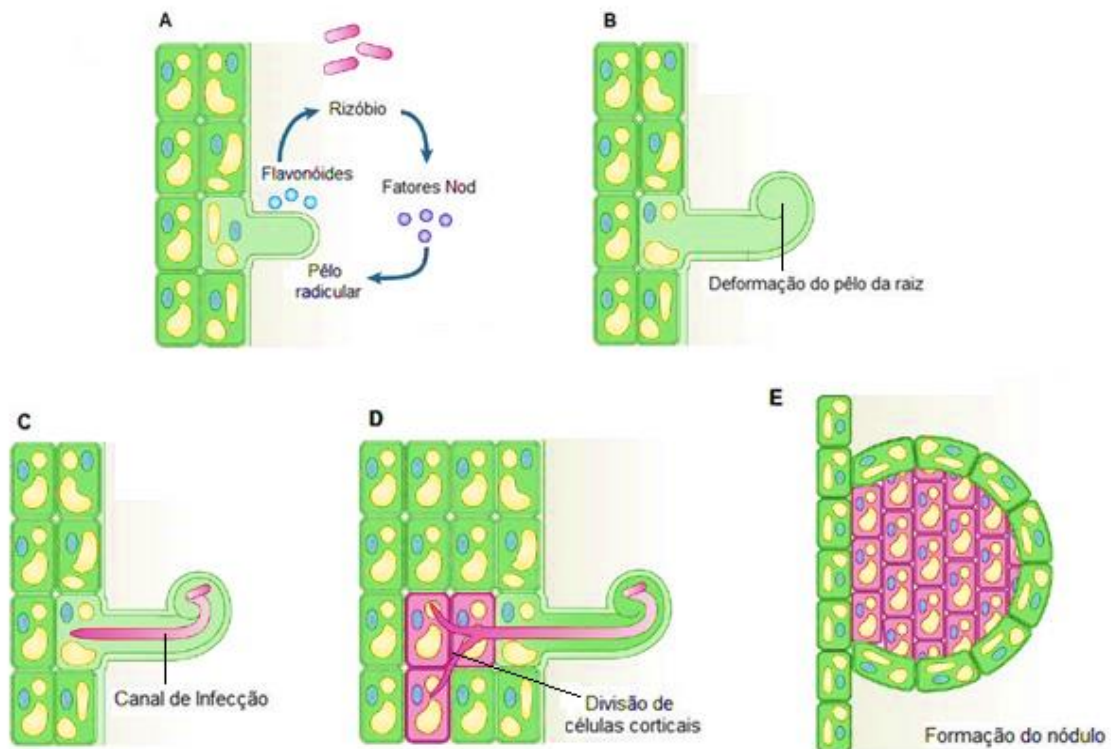


FIGURA 2 - PROCESSO DE NODULAÇÃO POR RIZÓBIO.

NOTA: (A) Troca de sinais moleculares coordenados e integrados entre planta e bactéria que liberam no solo flavonóides e fatores Nod, respectivamente. Elevada concentração de flavonóides atrai mais rizóbios para a região. (B) Em contato direto, sob indução de flavonóides, rizóbios produzem altas taxas de fatores Nod o que desencadeia o processo de curvatura do pêlo radicular que englobará os microrganismos. (C) Enzimas liberadas pela bactéria resultam na formação do cordão de infecção que se estende em direção às células do córtex da raiz. (D) O cordão de infecção se ramifica e bactérias migrantes colonizam as células vegetais, formando simbiossomos – em rosa. (E) Diferenciação de bactérias em bacteroides resulta na formação do nódulo onde ocorrerá a fixação biológica de nitrogênio.

FONTE: Adaptado de Deakin e Broughton (2009).

A produção de fatores Nod requer flavonóides e um regulador do tipo LysR, NodD1, que se liga à *nod-boxes* (NB) encontrados nas regiões promotoras de genes/operons responsáveis pela síntese de fatores Nod. Secreção de Nops também requer flavonóides, NodD1 e ainda a proteína reguladora TtsI (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2004). Esta última compartilha características de reguladores

de transcrição da família de sistemas de regulação de dois componentes (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2004). Estes são compostos por duas proteínas regulatórias, sendo uma delas um sensor e a segunda, um regulador de transcrição. Geralmente, a proteína sensora é uma histidina quinase que autofosforila um resíduo de histidina ao detectar um sinal do ambiente. O grupo fosforil é posteriormente transferido a um resíduo de aspartato no regulador de resposta, induzindo uma alteração conformacional que conduz à sua ativação. Uma vez fosforilada, reguladores da resposta atuam como ativadores de transcrição ligando-se a elementos *cis* dos promotores de genes necessários para processar o sinal do ambiente. TtsI, no entanto, possui um resíduo de glutamato em vez do aspartato. Em outros reguladores de resposta bacteriana, tal substituição conduz à ativação constitutiva, eliminando a necessidade de proteína sensora quinase. Assim, é possível que TtsI atue como um ativador transcricional independente da fosforilação ou de sensora quinase. Ao invés disso, a transcrição de *ttsI* e funções reguladas por TtsI são moduladas por NodD1 de forma dependente de flavonóides (KOBAYASHI *et al.*, 2004; MARIE *et al.*, 2004).

A proteína NodD1 de NGR234 é um ativador chave de loci cuja expressão é dependente da ligação a flavonóides para desencadear o processo de nodulação, sendo o mutante incapaz de nodular qualquer planta (RELIC *et al.* 1993; KOBAYASHI *et al.*, 2004). Uma nodulação eficiente requer regulação temporal precisa dos genes simbióticos. Proteínas NodD atuam como sensores do ambiente e modulam a expressão de genes precedidos de sequências regulatórias conservadas, chamadas *nod-boxes*. O plasmídeo simbiótico de *S. fredii* NGR234 carrega 19 *nod-boxes* (NB1 a NB19). Um dentre os flavonóides, a daidzeína, é capaz de induzir 18 dos 19 *nod-boxes* de forma dependente de NodD1. A indução de quatro *nod-boxes* (NB6, NB15, NB16 e NB17) é ainda modulada por NodD2, um regulador homólogo a NodD1, mas que não responde à flavonóides (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

O processo de interação entre *S. fredii* NGR234 e planta está representado de forma resumida na FIGURA 3.

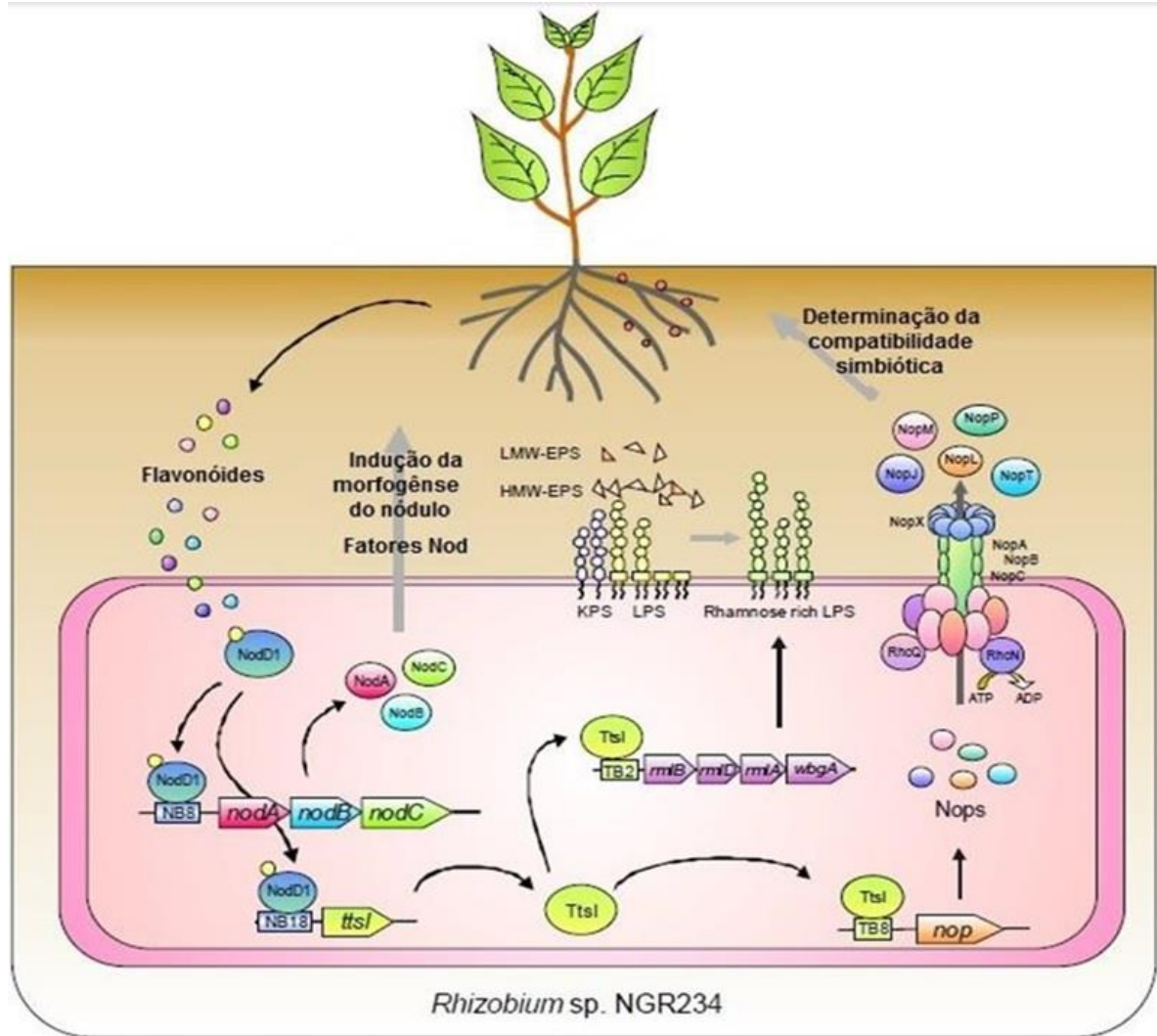


FIGURA 3 - MODELO DE INTERAÇÃO ENTRE *Sinorhizobium fredii* NGR234 E LEGUMINOSA.

NOTA: Flavonóides secretados pela raiz se ligam a proteína NodD1 que se liga a *nod*-boxes induzindo a transcrição de fatores Nod ou ativando *ttsI* que produzirá TtsI, que por sua vez se ligará a *tts*-boxes ativando TTSS e a síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose e proteínas externas de nodulação.

FONTE: Adaptado de KAMBARA, 2008.

Kobayashi *et al.* (2004) propôs uma cascata regulatória (FIGURA 4) que controla genes envolvidos na nodulação, entre os quais estão genes *nod*, *tts* e *lps*. Neste trabalho foi demonstrado que NB8 é dependente de NodD1 e que NodD2 está envolvido na repressão do operon *nodABC/Ino/Onoel*, que é o operon precedido por NB8. NB2, NB4, NB7, NB8 e NB12 reagem mais rápida e fortemente à presença de flavonóides, sendo NB8 o de maior nível de expressão. Por outro lado, o nível de expressão da região promotora que contém o NB18 é menor. Este *nod*-box controla a expressão de TtsI que por sua vez ativa a transcrição de todos os genes

precedidos por *tts-boxes* nas regiões regulatórias. Pelo menos 42 genes são ativados por TtsI, e estão organizados em 11 unidades transcricionais.

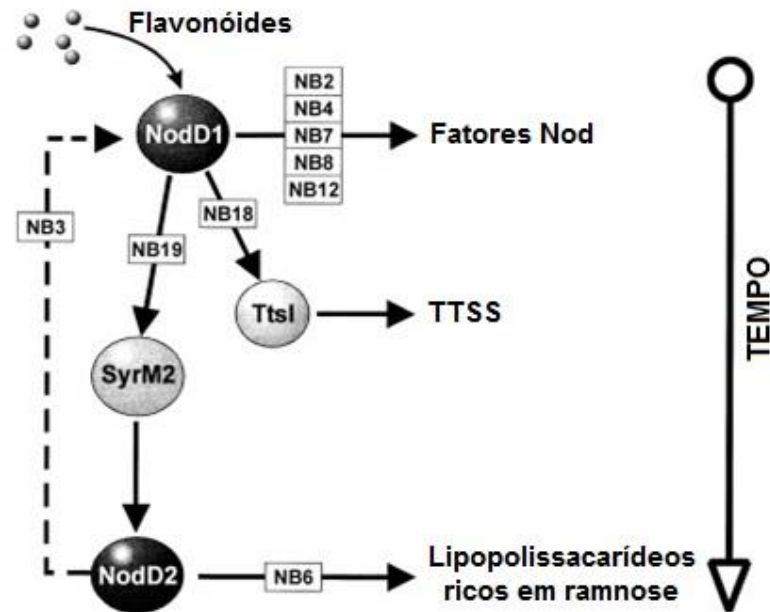


FIGURA 4 – MODELO PROPOSTO PARA A CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDES EM *Sinorhizobium fredii* NGR234.

NOTA: As linhas contínuas indicam atividade indutora, enquanto as linhas tracejadas indicam atividade repressora. TB = *tts-box*. NB = *nod-box*.

FONTE: Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2004.

O sequenciamento de inúmeros genomas de rizóbios revelou que a presença de T3SS e o controle deste por TtsI são relativamente comuns. A comparação das regiões promotoras de genes de T3SS de inúmeros rizóbios permitiu a identificação de um elemento *cis*-regulador denominado *tts-box* (TB) (KRAUSE *et al.*, 2002). TtsI se liga aos TB's e estimula a transcrição dos genes que possuem a sequência regulatória. Utilizando o consenso desta sequência, 11 TB's (TB1 a TB11) foram identificados em pNGR234a (MARIE *et al.*, 2004).

Cinco dos TB's estão localizados em genes/operons envolvidos na montagem da máquina de secreção do tipo III. Outros precedem genes que possivelmente codificam proteínas secretadas. TB's também são encontrados nos promotores de genes que codificam proteínas que não estão diretamente relacionados com as funções T3SS. Assim, TtsI potencialmente regula mais que T3SS e mutações em *ttsI* conduzem a diferentes fenótipos simbióticos do que a simples remoção da função T3SS (MARIE *et al.*, 2003; VIPREY *et al.*, 1998; WASSEM *et al.*, 2008).

Marie (2004) mostrou a localização dos *tts*-boxes (FIGURA 5). Cinco foram encontrados no *cluster* TTSS e estão a montante de *nopL*, *nopX*, *nopB*, *nopP* e *nopC*. Assim, parece que nesta região *tts*-boxes estão localizados a montante dos genes que codificam para proteínas secretadas por meio de TTSS ou que fazem parte da estrutura básica do sistema. Outros três foram encontrados a montante de *y4fR*, *y4IO* e *y4zC*, fases de leitura abertas que codificam proteínas supostamente homólogas a fatores de virulência secretados de forma TTSS-dependente por patógenos de plantas e animais. *Y4fR* é homóloga a YopM de *Yersinia* spp., enquanto *Y4IO* e *Y4zC*, homólogos a YopJ/AvrBsT e YopT, respectivamente (FREIBERG *et al.*, 1997; MARIE *et al.*, 2001). Isto sugere que estas proteínas podem ser secretadas por NGR234 de forma TtsI dependente por indução através de flavonóides.

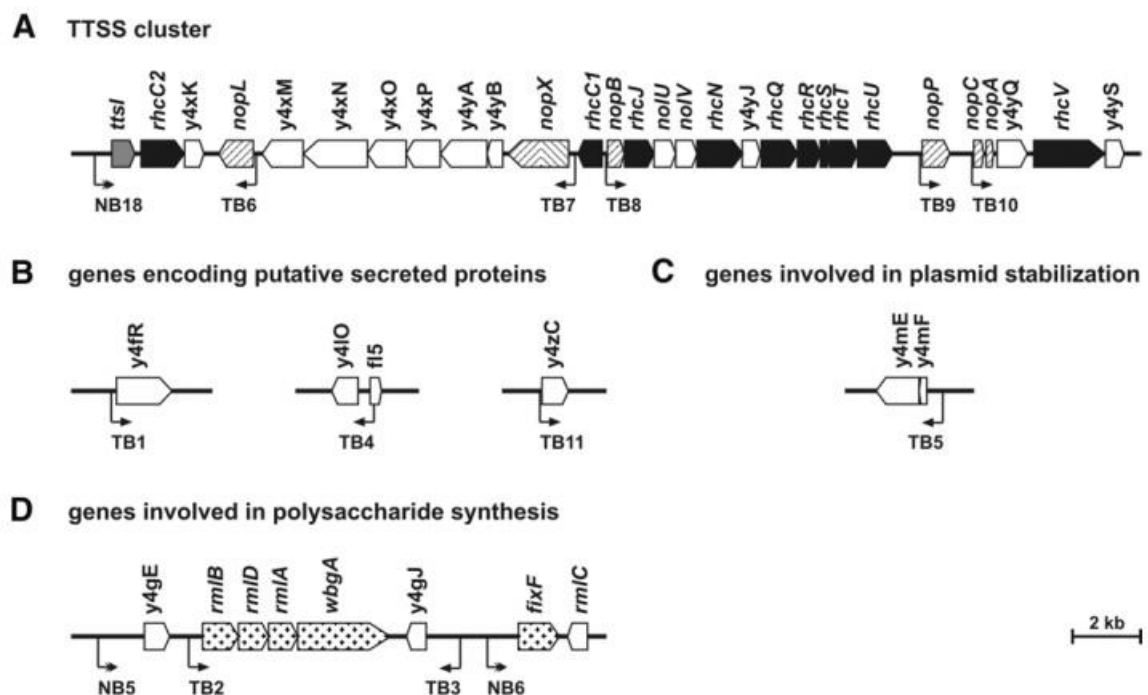


FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DAS FASES DE LEITURA ABERTAS CONTROLADAS POR *tts*-boxes.

NOTA: Os genes são representados por setas que mostram o sentido de transcrição. *ttsI* é mostrado em cinza. Loci que codificam para a maquinaria TTSS estão marcados em preto e os que codificam Nops estão preenchidos com linhas em diagonal.

FONTE: Marie *et al.*, 2004.

Independentemente da localização genômica descrita na figura 5, TB1, TB4, TB6, TB7, TB8, TB9, TB10 e TB11 estão em regiões promotoras de genes que codificam proteínas que serão secretadas por meio do TTSS de NGR234. TB5 se encontra localizado a montante de *y4mFE*, desempenhando papel estrutural do plasmídeo pNGR234a, atuando em seu particionamento. TB2 e TB3 atuam diretamente na síntese de polissacarídeos (MARIE *et al.*, 2004).

Wassem (2008) mostrou como é dada a ativação dos *tts*-boxes em NGR234 e NGR234 Δ *ttsI* (FIGURA 6) por indução via flavonóide, utilizando a daidzeína. Em seu trabalho foi sugerido que a maior intensidade de ativação foi de TB8, seguido por TB4, TB9, TB1, TB6 e TB11, respectivamente.

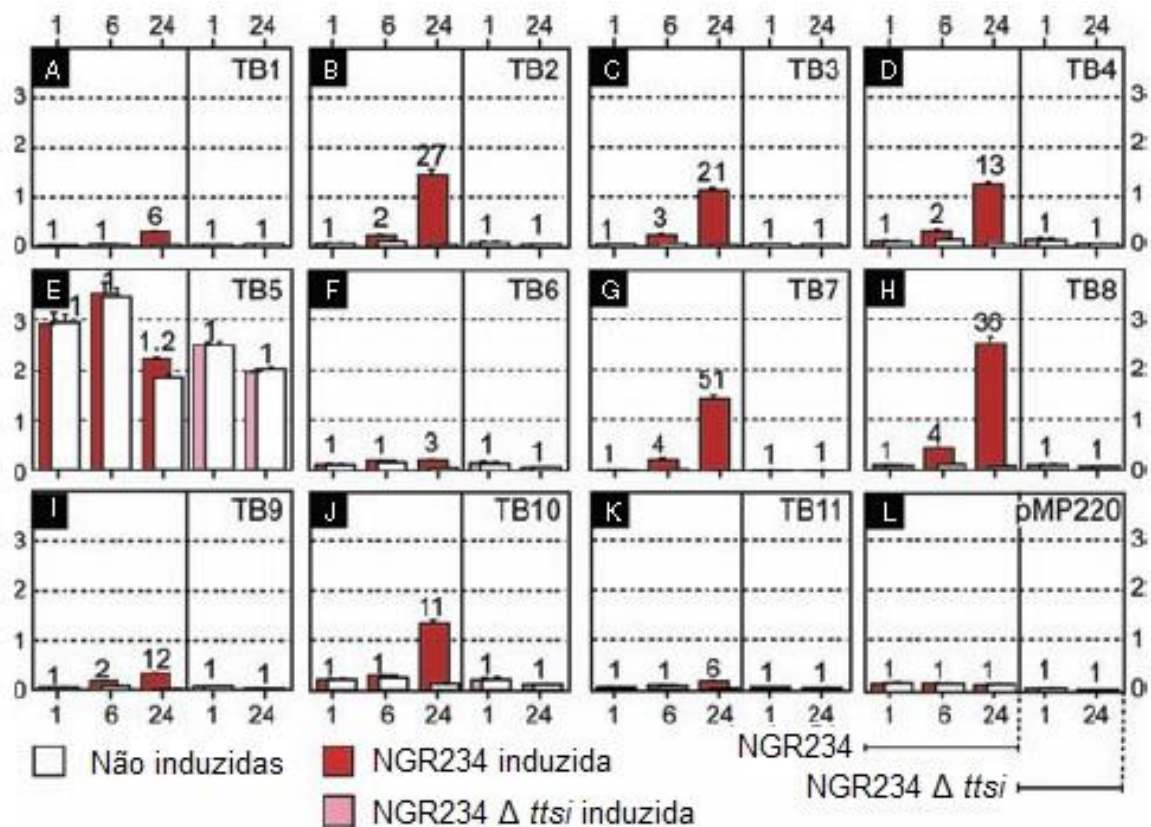


FIGURA 6 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES CONTENDO *tts*-boxes EM pNGR234a.

NOTA: Os gráficos representam os níveis de atividade de β -galactosidase dos 11 *tts*-boxes e do vetor pMP-220. Medições realizadas em 1, 6 e 24 horas pós indução (hpi) por daidzeína. Valores obtidos de indução em NGR234 são representados por barras vermelhas enquanto valores para o mutante *ttsI* por barras rosa.

FONTE: Adaptado de Wassem *et al.*, 2008.

3 OBJETIVO

Contribuir para um melhor entendimento do perfil de expressão gênica de genes contendo *tts-boxes* em *S. fredii* NGR234 durante diferentes fases dos nódulos. Como ainda não se sabe com exatidão o comportamento destes genes desde a invasão da planta pela bactéria será possível obter uma melhor compreensão deste complexo processo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA GERAL ADOTADA

As regiões regulatórias contendo os *tts-box* TB1, TB4, TB6, TB8, TB9, TB11 e o *nod-box* NB8 estavam clonadas nos sítios de policlonagem dos vetores pPROBE-GT ou pPROBE-GT', que são capazes de expressar GFP quando estas regiões regulatórias são ativadas. Estas fusões já se encontravam transformadas em *Escherichia coli* linhagem S17.1 e estocadas em glicerol 50%. Do mesmo modo a bactéria selvagem *S. fredii* NGR234 se encontra também estocada em glicerol 50%. Estas bactérias foram utilizadas em ensaios de conjugação de forma que a bactéria *S. fredii* NGR234 adquirisse os plasmídeos recombinantes. Depois de obtidas, as linhagens transconjugantes foram inoculadas em meio TY líquido contendo antibióticos e posteriormente em meio de cultura mínimo, RMS. Após crescimento em RMS o número de células em cada cultura foi padronizado para que fosse feita a inoculação em *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*.

Sementes de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram esterilizadas e transferidas para placas de Petri contendo meio apropriado para sua germinação, em seguida as sementes foram transferidas para frascos Magenta se transformando em plântulas, que posteriormente foram inoculadas com os rizóbios transconjugantes.

A cada 7 dias, em um período de até 21 dias após inoculação, plantas infectadas com cada uma das fusões foram selecionadas para que fossem feitos cortes de tecido, confecção de lâminas e análise por microscopia de fluorescência.

4.2 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>araD139</i> (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1 nupG</i>	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Sm ^R Spm ^R Tra ⁺ pro his <i>recA hsdR</i> (RP4- 2 kan::Tn7 tet;Mu, integrado no cromossomo)	SIMON; PRIEFER; PUHLER, 1983
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	Rif ^R derivado do tipo selvagem de NGR234	LEWIN <i>et al.</i> , 1990

TABELA 1 - ESTIRPES DE *Escherichia coli* E *Sinorhizobium fredii* NGR234 UTILIZADAS.

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
pPROBE-GT	Vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> sem promotor. Gm ^R	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000
pPROBE-GT'	Vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> sem promotor. Gm ^R	MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000
pGT-NB8	Contém a região <i>nod-box</i> 8 clonado no sítio <i>EcoRI</i> do vetor pPROBE-GT	WASSEM, R.
pGT-TB1	Contém a região <i>tts-box</i> 1 (470pb) clonada nos sítios <i>HindIII/PstI</i> do vetor pPROBE-GT	FIGIORESE, W.
pGT-TB4	Contém a região <i>tts-box</i> 4 (750pb) clonada nos sítios <i>HindIII/PstI</i> do vetor pPROBE-GT	FIGIORESE, W.
pGT-TB6	Contém a região <i>tts-box</i> 6 (380pb) clonada nos sítios <i>HindIII/PstI</i> do vetor pPROBE-GT	FIGIORESE, W.
pGT-TB8	Contém a região <i>tts-box</i> 8 clonada no vetor pPROBE-GT	WASSEM, R.
pGT'-TB9	Contém a região <i>tts-box</i> 9 (420pb) clonada nos sítios <i>XhoI/PstI</i> do vetor pPROBE-GT'	FIGIORESE, W.
pGT'-TB11	Contém a região <i>tts-box</i> 11 (400pb) clonada nos sítios <i>BamHI/PstI</i> do vetor pPROBE-GT'	FIGIORESE, W.

TABELA 2 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

4.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani Agar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989), com incubação a 37°C. A composição do meio LA consistiu em: 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 10 g/L de triptona e 1,5% de ágar no meio. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Sinorhizobium fredii NGR234 foi cultivado em meio TY (*triptone yeast*) (BERINGER, 1974) a 28°C sob agitação constante a 120 rpm quando estava em meio líquido. O meio TY possuía a seguinte composição: 3g/L de extrato de levedura, 0,87 g/L de CaCl₂.H₂O e 5 g/L de triptona. O pH do meio foi ajustado para 6,8 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1M quando necessário realizar o aumento do pH do meio, quando necessário diminuir o pH do meio foi utilizado ácido clorídrico (HCl).

O meio mínimo para rizóbio (RMS) foi preparado a partir de soluções estoque individuais que foram adicionadas a um volume desejado de água estéril. As soluções I-A, I-B, II, III e IV foram esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 minutos enquanto a solução de succinato de sódio foi filtrada. As Composições de soluções estoque estão representadas na tabela 3.

Solução	Composição
I-A	205 g/L K ₂ HPO ₄ ; 145 g/L KH ₂ PO ₄ ; 15 g/L NaCl
I-B	50 g/L NH ₄ NO ₃
II	50 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O
III	2,5 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O
IV	123 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O; 87 g/L K ₂ SO ₄ ; 0,34 g/L; MnSO ₄ .H ₂ O; 0,25 g/L H ₃ BO ₃ ; 0,29 g/L ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g/L CuSO ₄ .5H ₂ O; 0,06g/L; CoSO ₄ .7H ₂ O; 0,05 g/L Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
Vitaminas	Gamborg 1000X (Sigma)
Succinato de sódio	324 g/L C ₄ H ₄ O ₄ Na ₂ .6H ₂ O

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

Para o preparo de 100 mL de meio de cultura RMS foram utilizados 95,7 mL de água destilada autoclavada a 120°C por 20 minutos, 1 mL das soluções I-A, I-B e II e

de succinato de sódio – fonte de carbono, 100 µL das soluções III e IV e de vitamina Gamborg, nesta ordem.

O meio nutritivo para plantas B&D foi preparado a partir de soluções estoque individuais, vistas na tabela 4.

Solução	Composição
A	CaCl ₂ .H ₂ O, 2M
B1	KH ₂ PO ₄ , 1M
B2	K ₂ HPO ₄ , 1M
C	FeC ₆ H ₆ O ₇ .H ₂ O, 0,02M
D	MgSO ₄ , 0,5M; K ₂ SO ₄ , 0,5M; MnSO ₄ , 2mM; H ₃ BO ₃ , 4mM; CuSO ₄ , 4mM; CoSO ₄ , 0,2mM; ZnSO ₄ , 1mM; Na ₂ MoO ₄ , 0,2mM

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO B&D.

Para o preparo de 10 L de meio B&D foram utilizados 9,75 L de água destilada e 5 mL de cada uma das soluções estoque na seguinte ordem: D, B2, A, B1 e C. O pH do meio foi ajustado para 7.0 utilizando hidróxido de potássio (KOH) 1M quando necessário realizar o aumento do pH do meio, quando necessário diminuir o pH do meio foi utilizado HCl. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

4.4 ANTIBIÓTICOS

Os meios de cultivo foram suplementados com as seguintes concentrações de antibióticos: gentamicina (Gm) 15 µg/mL e rifampicina (Rif) 50 µg/mL. A escolha do antibiótico utilizado foi feita de acordo com o plasmídeo.

4.5 CONJUGAÇÃO BACTERIANA E SELEÇÃO

Para a conjugação entre *E. coli* e *S. fredii* NGR234, inicialmente, as culturas foram crescidas em placas de Petri com meio de cultura e antibióticos adequados. No dia posterior foi confeccionada placa de Petri contendo meios LA e TY sólido (1:1) sem antibióticos. Utilizando uma alça estéril foram coletadas alças de cada cultura e misturadas na placa de conjugação que foi incubada a 28°C por 24 horas.

Com o intuito de selecionar apenas os tranconjugantes um *loop* da mistura da placa de conjugação foi transferido para nova placa contendo apenas o meio TY sólido, antibiótico rifampicina (neste caso com concentração de 100 µg/mL) e o antibiótico de resistência do plasmídeo.

4.6 CULTIVO DE PLANTAS

4.6.1 PREPARO DE SUBSTRATO PARA CULTIVO DE PLANTAS

O substrato utilizado para o cultivo das plantas foi vermiculita expandida, pois esta não apresentava nutrientes que pudessem interferir ou influenciar no desenvolvimento da planta. A vermiculita foi lavada com água corrente entre 3 e 4 horas e escorrida por 24 horas, para remoção do excesso de água.

4.6.2 PREPARO DE POTES DE CULTIVO DE PLANTAS

Os potes de cultivo utilizados, frascos Magenta, consistiam em dois recipientes, um superior e um inferior, acoplados. O recipiente superior possuía um orifício em sua parte basal onde um pavio de papel filtro foi posto possibilitando o contato entre a planta e o meio de cultura (B&D), localizado no compartimento inferior, com a finalidade de manter o substrato umedecido, além de fornecer sais mínimos para o desenvolvimento da planta. O substrato foi colocado no recipiente superior, que foi fechado com uma tampa. 28 potes foram preparados e autoclavados por 20 minutos a 120°C para posteriormente receberem as plântulas.

4.6.3 DESINFECÇÃO DE SEMENTES

Com o intuito de eliminar quaisquer microrganismos existentes no tegumento foi realizada a desinfecção das sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* em capela. A seleção foi feita manualmente sendo selecionadas 28 sementes de cada espécie que apresentaram aspecto mais saudável e vistoso quando comparadas as demais.

A desinfecção das sementes de *P. vulgaris* foi realizada por imersão em ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado por 10 minutos, com agitação manual suave. O ácido foi removido e as sementes lavadas com água ultra pura em abundância por 10

vezes para a máxima remoção possível do ácido. A desinfecção das sementes de *V. unguiculata* foi realizada por imersão em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 10 minutos. O ácido foi removido e as sementes foram lavadas com água ultra pura por uma vez e em seguida imersas em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5% por 5 minutos. O peróxido foi removido e outra lavagem foi realizada. Na sequência as sementes foram imersas em etanol 70% por 5 minutos. Em todas as etapas de imersão da semente houve agitação manual suave. Por fim foi feita a remoção do etanol e as sementes foram lavadas com água ultra pura em abundância por 10 vezes para a máxima remoção possível dos resíduos.

4.6.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Após desinfecção, as sementes foram transferidas para placa de Petri contendo solução B&D acrescido de 0,5% de ágar. As placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas a 25°C por 48 horas, até que as sementes germinassem, apresentando radículas de tamanho aproximado de 3 cm.

4.6.5 TRANSFERÊNCIA DE SEMENTES PARA POTES DE CULTIVO

Em ambiente estéril, as sementes germinadas foram transferidas para os potes de cultivo previamente preparados. Uma pequena abertura foi feita no substrato com o auxílio de pinça estéril, onde as sementes germinadas foram acomodadas no substrato, com suas radículas voltadas para baixo. Os potes foram fechados e levados até uma câmara de cultivo em condições reguladas de luminosidade (fotoperíodo – 16 horas), temperatura (diurna, 24°C e noturna, 20°C) e umidade (70%). Os frascos Magenta permaneceram fechados na câmara por 48 horas até que as sementes germinadas se desenvolvessem em plântulas. Após este período de desenvolvimento foi feito o transporte para o laboratório onde as plântulas receberam os inóculos de bactérias.

4.6.6 PREPARO DE INÓCULOS

Para a obtenção dos inóculos, a estirpe *S. fredii* NGR234 foi cultivada em meio TY líquido contendo os antibióticos rifampicina e gentamicina pelo período de 12

horas. Uma alíquota foi transferida para o meio mínimo RMS contendo os antibióticos rifampicina e gentamicina pelo período de 24 horas. Na sequência, nova alíquota foi transferida para o meio mínimo RMS sem antibióticos permanecendo pelo período de 24 horas. Essas três etapas ocorreram sob agitação contínua a 120 rpm e a temperatura de 28°C. Em seguida a D.O.₆₀₀ das culturas foi mensurada por espectrofotometria com o intuito de realizar o cálculo do volume de cultura a ser centrifugado para obtenção de D.O. de 0,7. Seguindo protocolo, por duas vezes as culturas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células foram lavadas com sulfato de magnésio (MgSO₄) 10 mM. As amostras foram diluídas 10X na mesma solução para a obtenção de um número aproximado de 10⁸ células por mililitro. Após a preparação dos inóculos os potes contendo as plântulas tiveram suas tampas removidas e foi feita a inoculação, próxima a radícula, de 300 µL de solução contendo bactérias da estirpe NGR234. Cada uma das estirpes foi inoculada em 4 diferentes plantas. O substrato foi coberto com uma camada de esferas de propileno estéreis com o intuito de isolá-lo do ambiente, evitando possíveis contaminações. As plantas foram devolvidas à câmara de cultivo permanecendo por 21 dias. Sempre que necessário o meio de cultivo B&D foi repostado nos potes em ambiente estéril.

4.7 PREPARO DE LÂMINAS E MICROSCOPIA

As plantas permaneceram incubadas durante todo o período dos experimentos e um exemplar referente a cada estirpe inoculada foi selecionado a cada 7 dias, desde o dia da inoculação, para remoção e corte dos tecidos a serem estudados.

Após 7 dias foram coletadas raízes com o objetivo de se observar os pelos radiculares. Após 14 e 21 dias foi feita a remoção de, respectivamente, primórdios de nódulos e nódulos maduros das raízes das plantas. Estes foram coletados e fatiados utilizando micrótomo. Todos os tecidos foram postos sobre lâminas de vidro e cobertas com lamínulas. As lâminas confeccionadas foram levadas para microscopia de fluorescência e analisadas qualitativamente com intuito de observar a expressão dos genes estudados por meio de GFP.

As imagens de pelos radiculares foram produzidas no microscópio Zeiss Axio Observer A1 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland), utilizando objetivas de 20X. Para GFP foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo (*band pass*) de 500-

550nm. O programa *AxioVision* Rel. 4.8 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) foi utilizado para a visualização das imagens.

Os cortes de primórdios e de nódulos maduros foram confeccionados no micrótomo Leica VT1000S (LEICA, Nussloch, Deutschland). A espessura dos cortes foi regulada em 30 μm . Suas imagens foram produzidas no microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 20X. Para GFP foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo (*band pass*) de 500-550nm. O programa *Imaging Software Nis Elements 4.20* (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e produção de animações em 3D pelo uso das fatias ópticas (*Z slices*).

4.8 CÁLCULO DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA

Os cálculos finais relativos à intensidade de fluorescência, emitida pelas células vegetais colonizadas por bactérias (simbiossomos), foram realizados em unidades arbitrárias. 10 simbiossomos expressando GFP em cada imagem de nódulo maduro, obtida por microscopia, foram selecionados. Estas células foram analisadas tendo sua área e a intensidade de emissão de fluorescência mensurados, utilizando o *Imaging Software Nis Elements 4.20*. Com os valores obtidos, foi feita a razão entre fluorescência e área de cada uma das células, obtendo assim um valor para cada célula. Destes resultados foi calculada a média aritmética chegando ao valor real de emissão de fluorescência. Os resultados foram multiplicados por 1000, gerando os valores finais apresentados neste trabalho.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE GERAL POR MICROSCOPIA

Inicialmente, a linhagem selvagem *S. fredii* NGR234 recebeu plasmídeos contendo fusões transcricionais de genes de interesse com o gene *gfp*. Estas linhagens foram inoculadas em *V. unguiculata* e *P. vulgaris* e o perfil de expressão dos genes de interesse foi avaliado por microscopia de fluorescência.

Todo o processo de desenvolvimento de nódulos, desde a infecção das plantas, foi acompanhado e as análises de expressão dos genes alvo foram

realizadas. Em concordância com o modelo de indução por flavonóides destes genes, houve expressão de GFP em todos os tecidos analisados para as duas espécies de plantas.

Foi possível observar que os pelos radiculares apresentaram pontos de colonização por bactérias em suas superfícies e por diversas vezes foi notada a curvatura do ápice dos pelos, que é a primeira resposta visual da troca de sinais moleculares (flavonóides e fatores Nod) entre a planta e *S. fredii* NGR234. Nesta fase ocorre o englobamento do microrganismo pelo vegetal, que posteriormente migra em direção às células corticais da raiz por meio do cordão de infecção. Imagens do cordão não foram obtidas neste trabalho, pois não foram observadas, uma vez que sua formação é pouco frequente.

Nas fases posteriores à migração, crescimento e diferenciação da bactéria em bacteroide, ocorre o desenvolvimento das estruturas denominadas nódulos. Os nódulos, em seus estágios iniciais, ditos primórdios, ainda não possuem a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio, mas expressaram GFP. Esta expressão foi observada em todas as linhagens, ocorrendo em diferentes intensidades, dependendo do gene analisado. Variações nos níveis de expressão destes genes, após indução de flavonóides adicionados ao meio de cultura, ou seja, em vida livre, também foram observados por Wassem *et al.* (2008).

Os nódulos maduros representaram a fase onde ocorreram os maiores níveis de expressão. Assim como em primórdios, a expressão foi diferenciada entre cada gene. Como esta fase apresentou os níveis mais altos de expressão e, devido a maior homogeneidade no tecido, os níveis de expressão de todas as fusões foram quantificados, levando em consideração a área analisada e sua emissão de fluorescência. Os resultados mostraram que os *tts-boxes* são expressos em diferentes níveis dependendo da planta na qual ele foi inserido.

5.1.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM *Vigna unguiculata*

As análises de pelos radiculares de *V. unguiculata* mostraram que TB6 (gene *nopL*) promoveu maior nível de emissão de fluorescência. NB8 (*nodABC*) e TB9 (*nopP*) foram também muito expressos, mais do que os outros *tts-boxes* analisados. TB1 (*nopM*), TB8 (*nopB*) e TB11 (*nopT*) apresentaram resultados similares entre si, sendo bem expressos, porém em menor intensidade que os *tts-boxes* já descritos.

TB4 (*nopJ*) teve pouca expressão, sendo a mais baixa dentre todos, apesar de detectável, sendo até mesmo difícil obtenção de imagens de seus pelos radiculares em filtro de fluorescência.

Os primórdios de nódulos e nódulos maduros apresentaram emissão elevada de fluorescência. Os níveis de expressão em nódulos maduros foram maiores que os vistos nos primórdios, indicando que o TTSS é importante para a manutenção da colonização do nódulo. O padrão de colonização foi uniforme em todas as linhagens e a expressão observada nos primórdios se manteve em níveis similares até atingirem a maturidade. Ou seja, todas as regiões analisadas, apesar de diferentes níveis entre si, mantiveram o mesmo até o completo desenvolvimento do nódulo, não tendo variação de acordo com a fase de desenvolvimento. Ao realizar as observações dos nódulos (primórdios e maduros), TB6 foi visto com maior nível de fluorescência, sendo esta muito superior a quaisquer outras. TB8 foi visto com o segundo maior nível, seguido por NB8, TB1 e TB11, com padrões equiparados. Na sequência, TB9 foi observado com emissão um pouco inferior aos três anteriores, enquanto TB4 não emitiu fluorescência.

As figuras 7 a 13 mostram as imagens dos cortes de tecidos realizados e de raízes colonizadas por NGR234 contendo as fusões descritas.

NB8

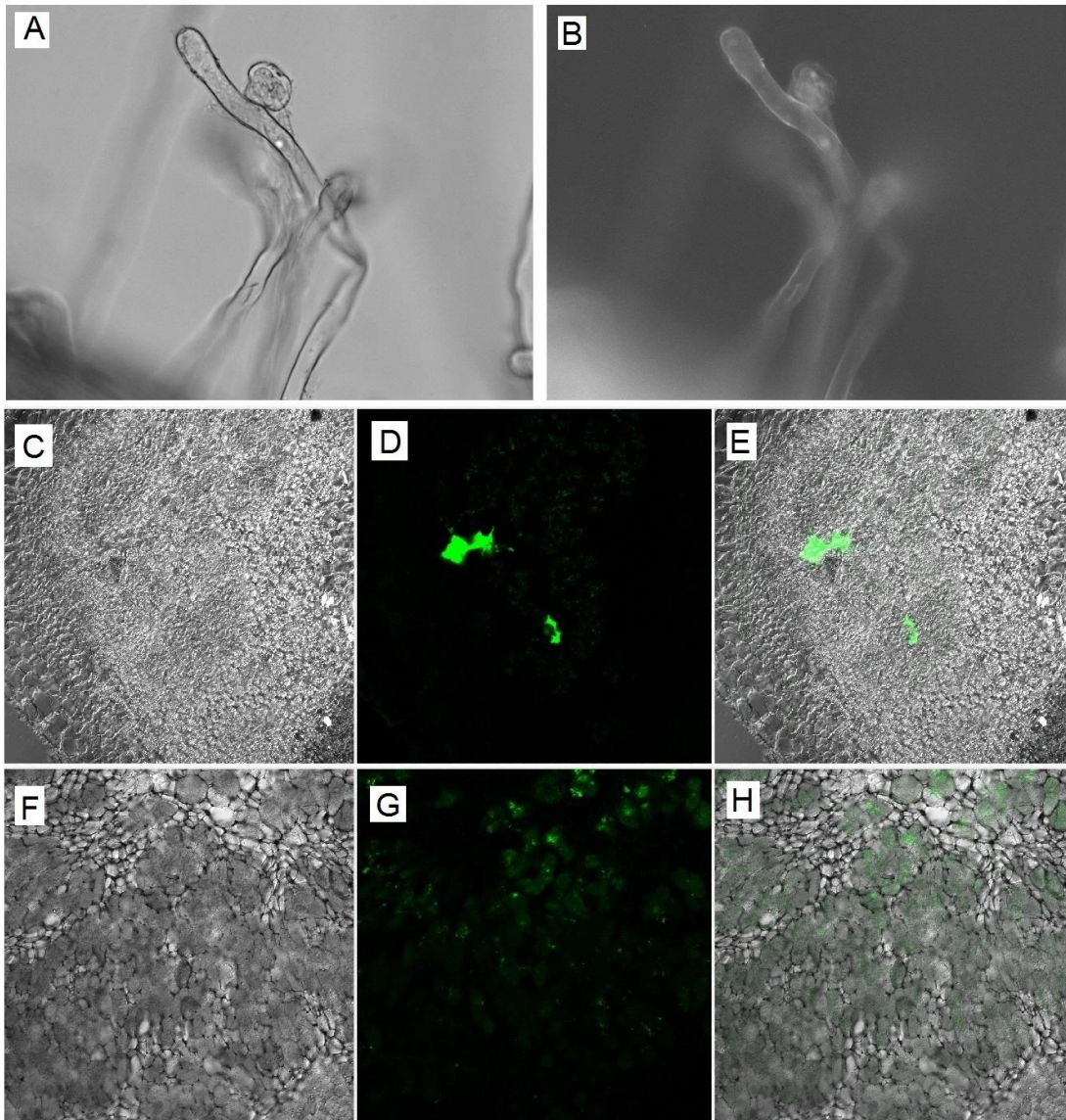


FIGURA 7 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-NB8).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB1

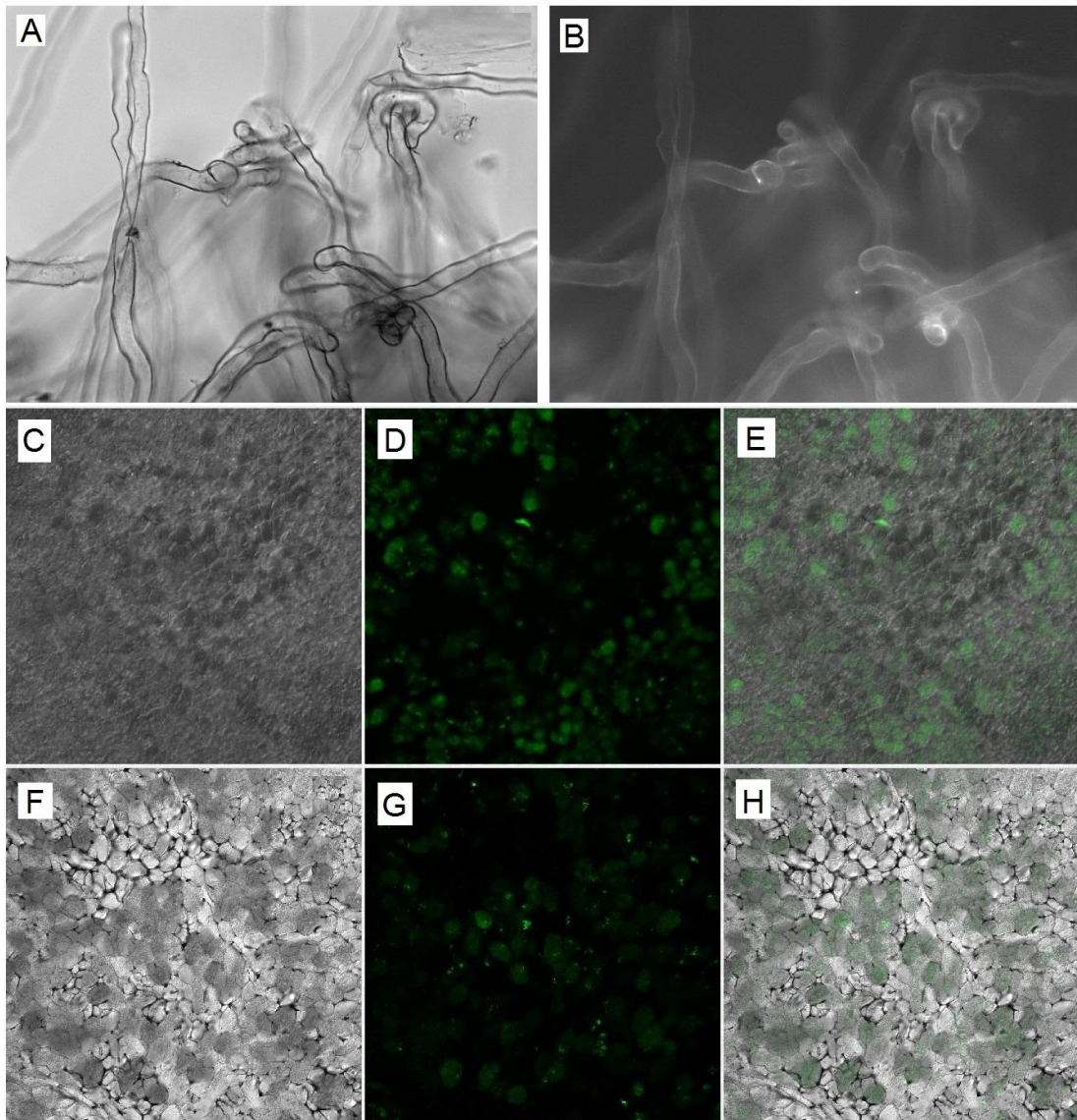


FIGURA 8 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB1).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB4

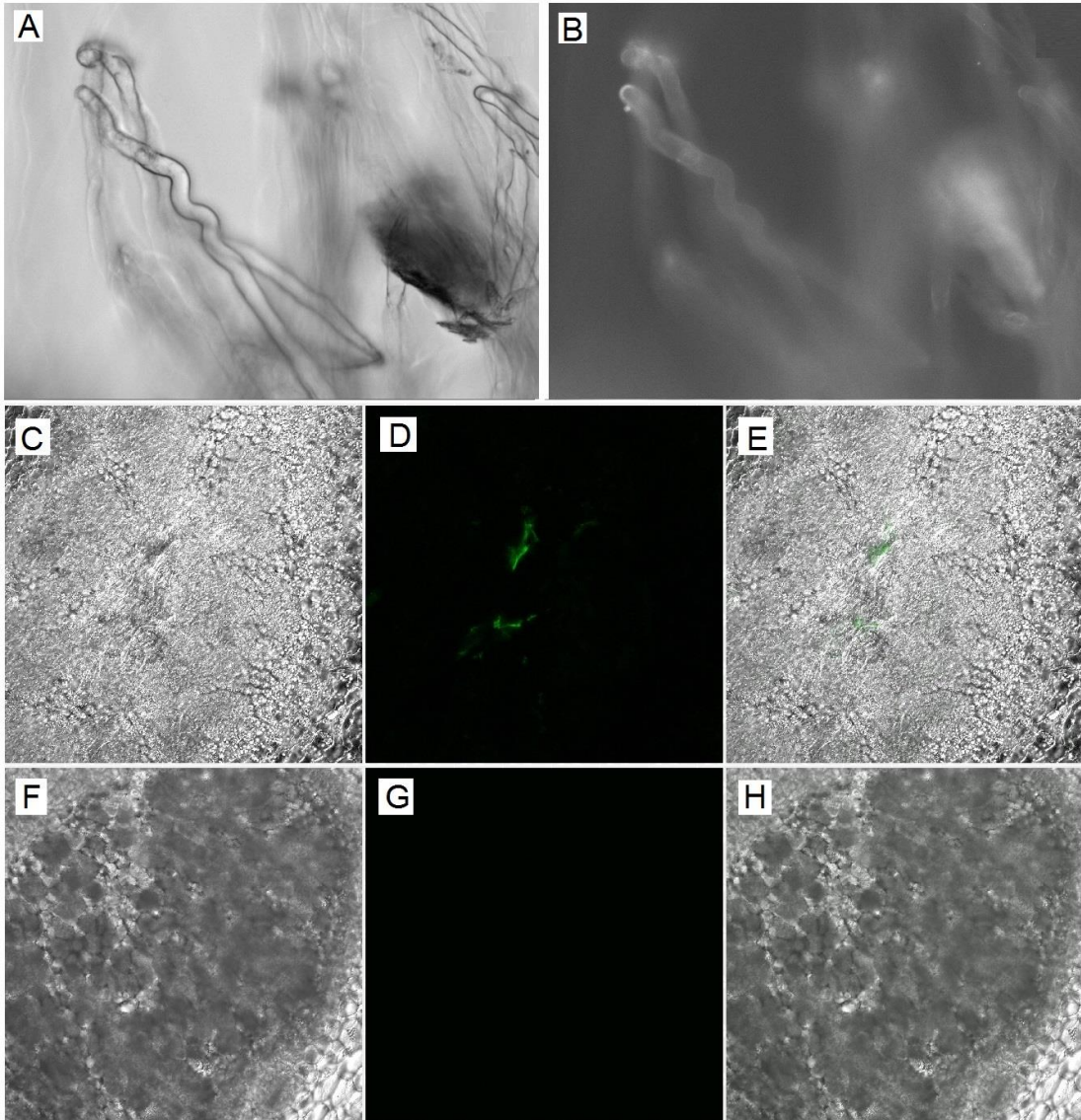


FIGURA 9 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB4).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB6

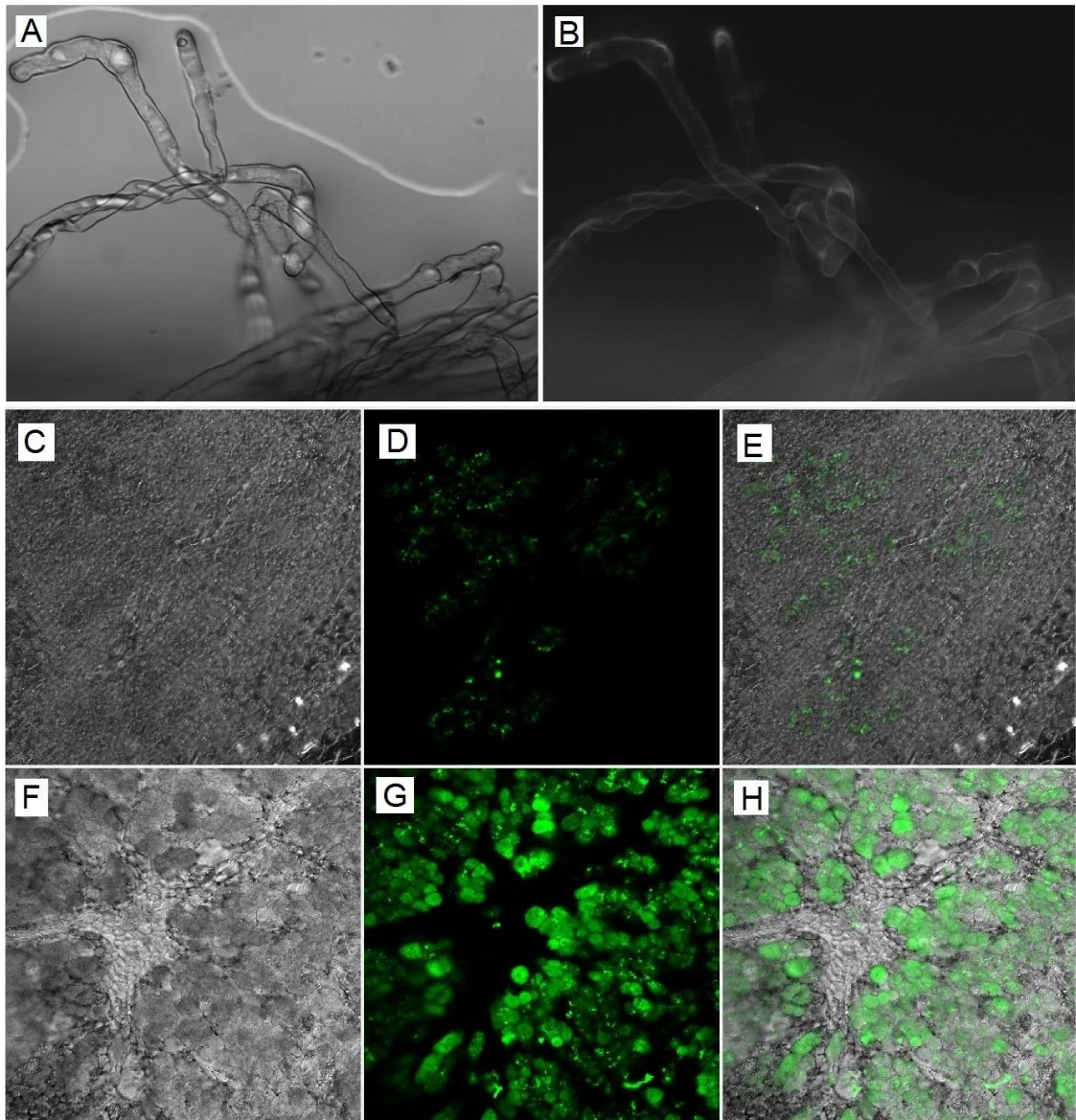


FIGURA 10 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB6).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB8

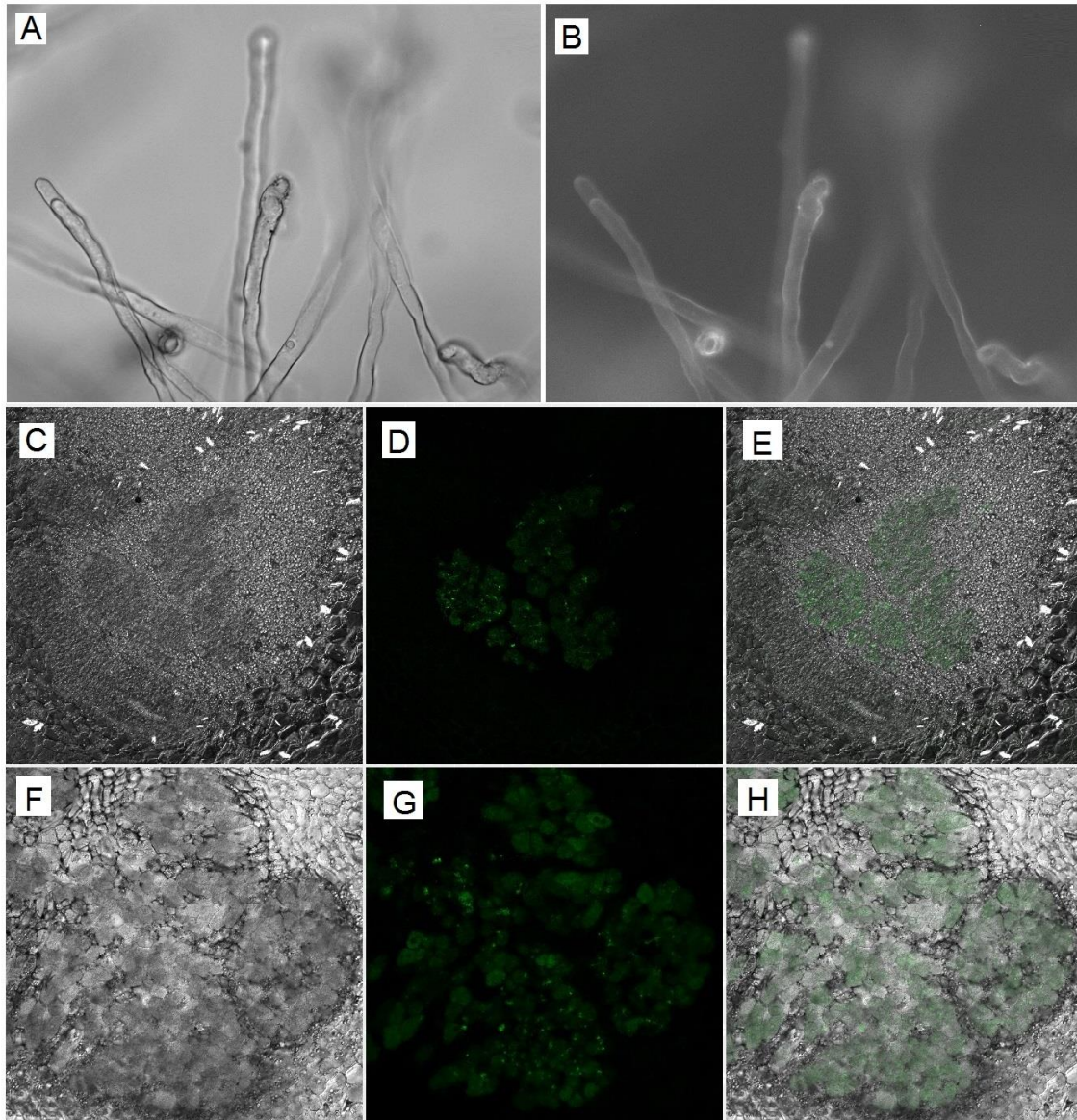


FIGURA 11 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB8).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB9

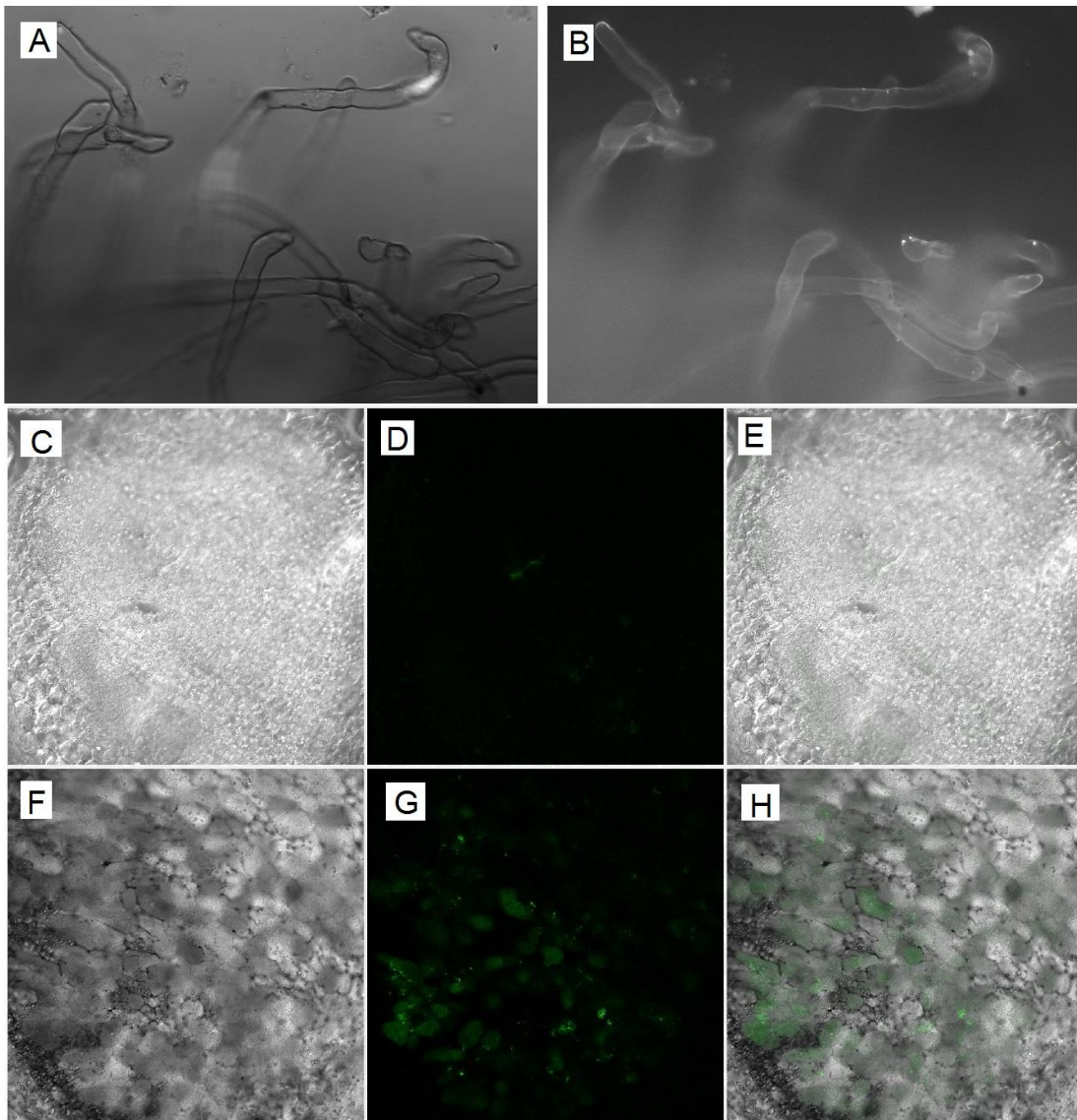


FIGURA 12 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT'-TB9).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB11

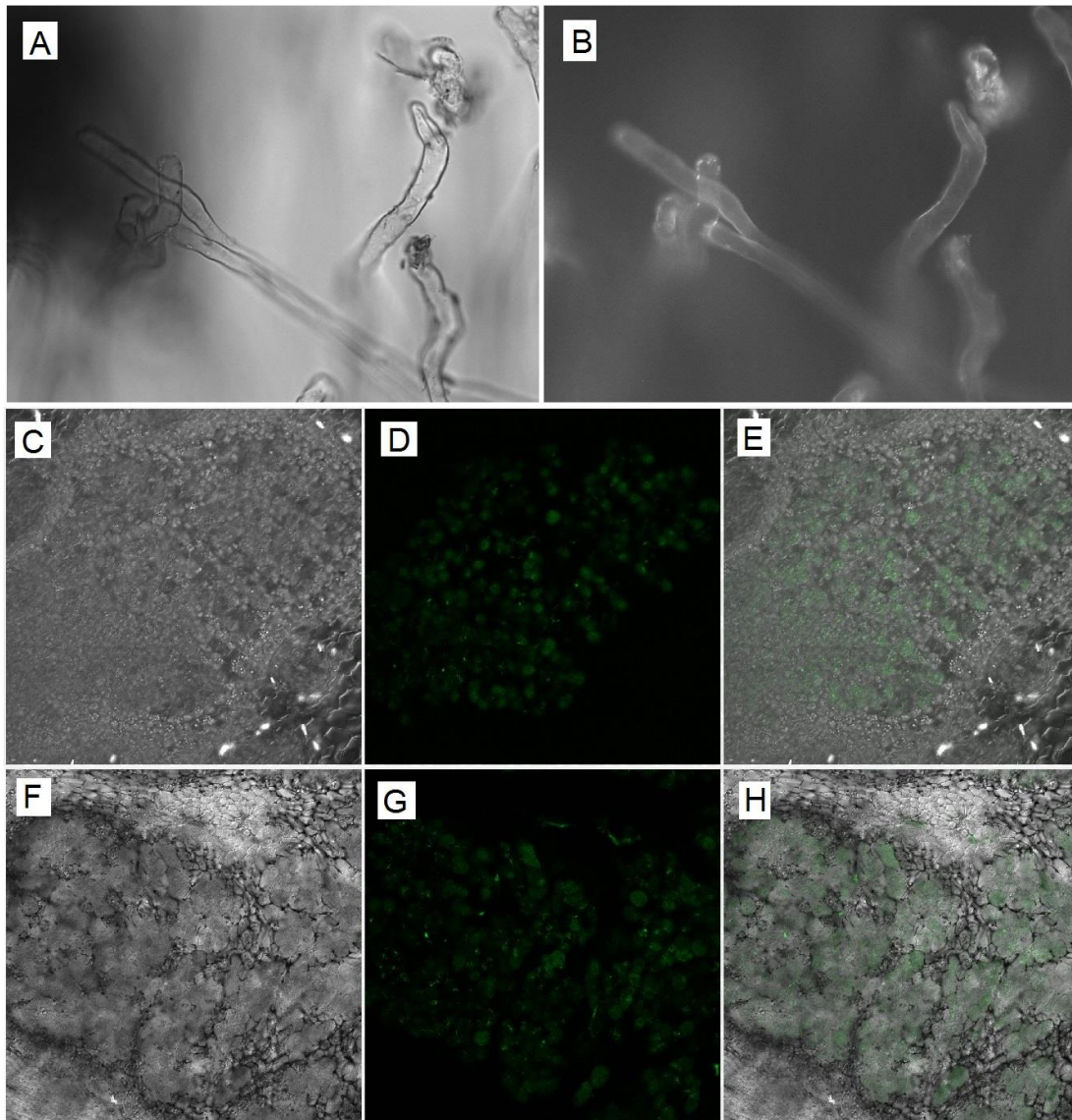


FIGURA 13 - CORTES TECIDUAIS DE *Vigna unguiculata* INFECTADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB11).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

Após a obtenção das imagens de nódulos maduros, estas foram analisadas quantitativamente, com o objetivo de avaliar os diferentes níveis de expressão de forma mais precisa. Os resultados obtidos de intensidade de fluorescência em *V. unguiculata* confirmam que existe diferença nos níveis de expressão de genes controlados por *tts-boxes* (FIGURA 14).

Os níveis de expressão mais altos foram produzidos por: TB6, TB8, NB8, TB1, TB11 e TB9, respectivamente, enquanto em TB4 não foi detectada emissão neste experimento, onde foram realizadas todas as análises.

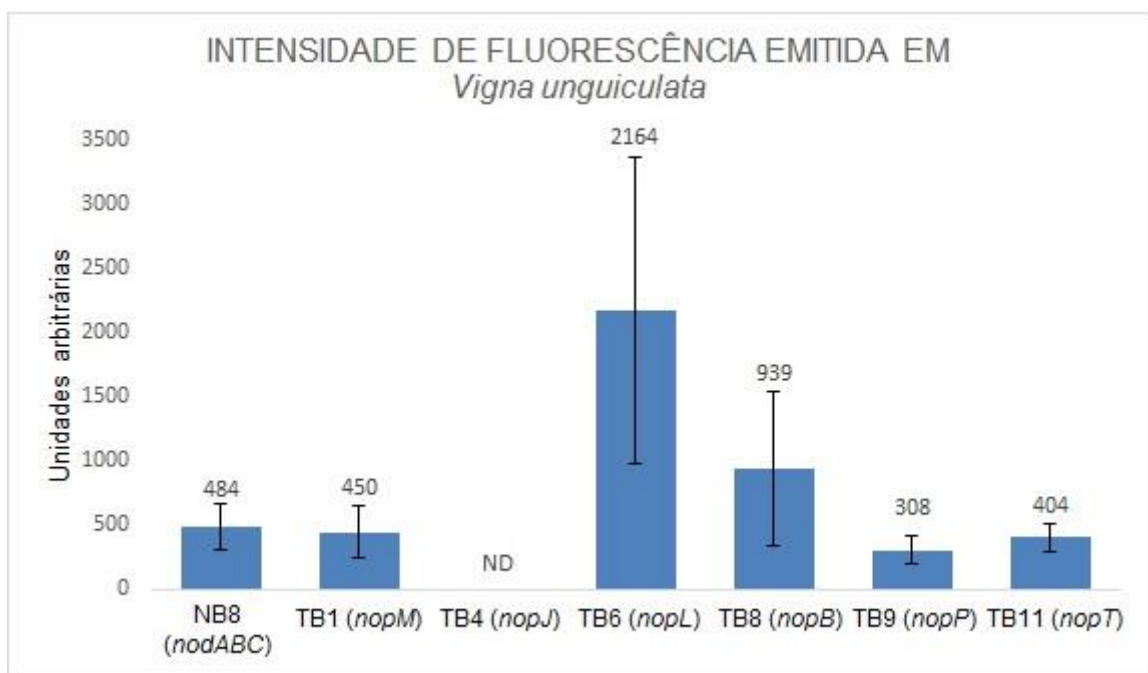


FIGURA 14 – INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM *Vigna unguiculata* COLONIZADA POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 CONTENDO AS FUSÕES INDICADAS.

NOTA: Os valores representam as médias das intensidades de fluorescência emitida calculadas nos simbiossomas. ND = não detectada.

FONTE: O autor, 2016.

Apesar de não ter sido detectada fluorescência sendo emitida por TB4 (em nódulos maduros), esta foi detectada anteriormente. O experimento de nodulação em *V. unguiculata* foi realizado duas vezes para que os resultados fossem mais bem consolidados. No primeiro experimento houve expressão em TB4, porém no segundo experimento os nódulos maduros não apresentaram colonização, ou ainda, foram colonizados, porém os bacteroides não foram capazes de emitir fluorescência. Os resultados do primeiro experimento não estão sendo exibidos neste trabalho,

pois os dados aqui mostrados se referem ao segundo experimento onde todas as configurações de microscopia foram ajustadas de maneira uniforme. Desta forma é possível dizer que TB4 também é expresso, apesar dos baixos níveis.

5.1.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO EM *Phaseolus vulgaris*

As análises de pelos radiculares de *P. vulgaris* não evidenciaram nenhum dos *tts-boxes* se destacando em relação aos demais quanto à fluorescência emitida. Existiram diversos pontos de colonização por bactéria na superfície dos pelos e foi notada a curvatura dos pelos em todas as linhagens.

Os primórdios de nódulos e nódulos maduros apresentaram emissão elevada de fluorescência. Os níveis de expressão em nódulos maduros foram maiores que os vistos nos primórdios. O padrão de colonização foi uniforme em todas as linhagens e a expressão nos nódulos maduros se mostrou coerente com a observada nos primórdios, ou seja, se manteve semelhante. TB8 foi visto como maior emissor de fluorescência, sendo muito superior a quaisquer outras. Na sequência, NB8 e TB9 pareceram ter emissão equiparada, seguido por TB1, TB6 e TB11, com padrões semelhantes. Por último, TB4 foi o mais fraco emissor de fluorescência.

As figuras 15 a 21 mostram as imagens dos cortes de tecidos realizados e de raízes colonizadas por NGR234 contendo as fusões descritas.

NB8

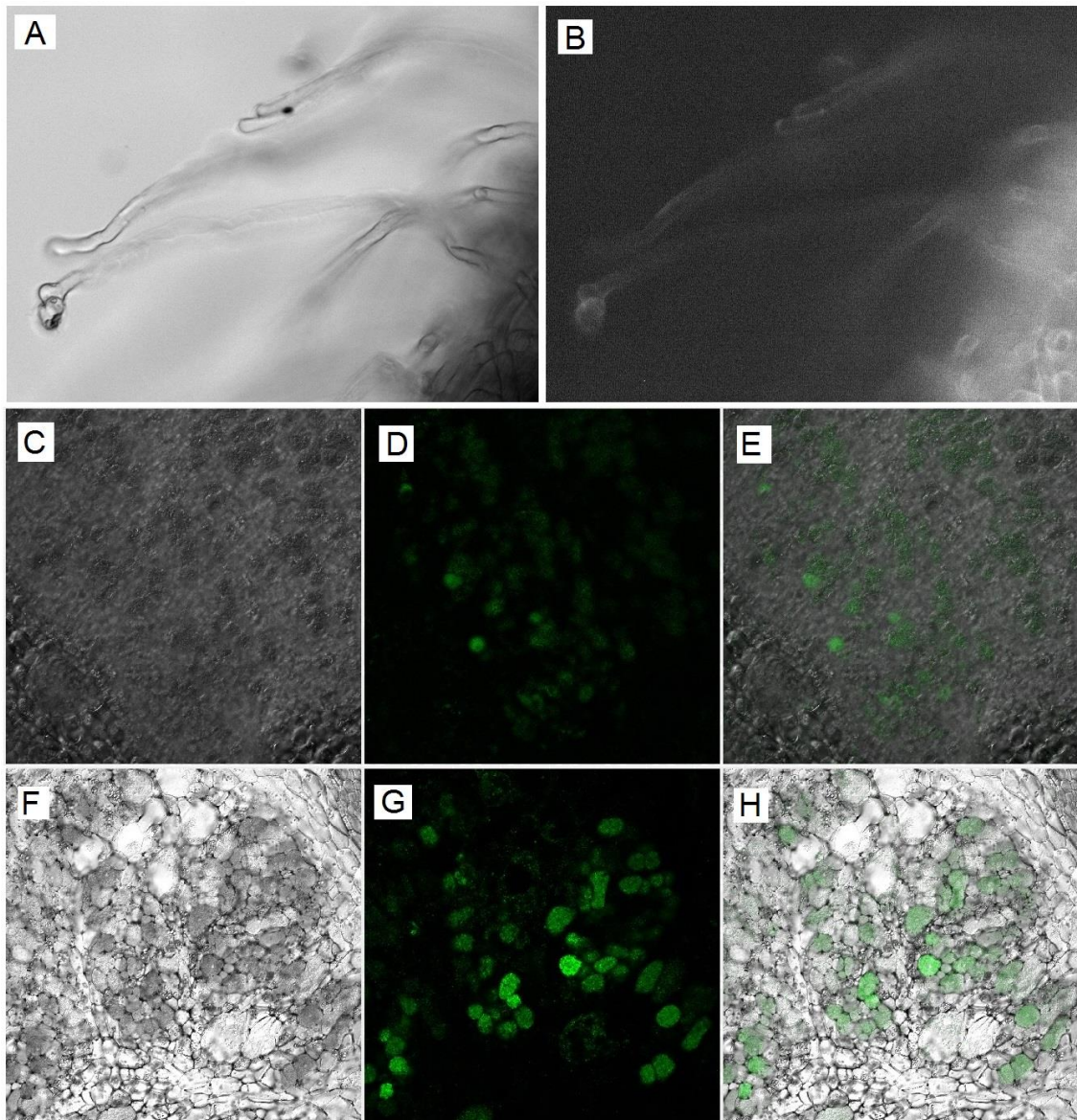


FIGURA 15 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-NB8).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB1

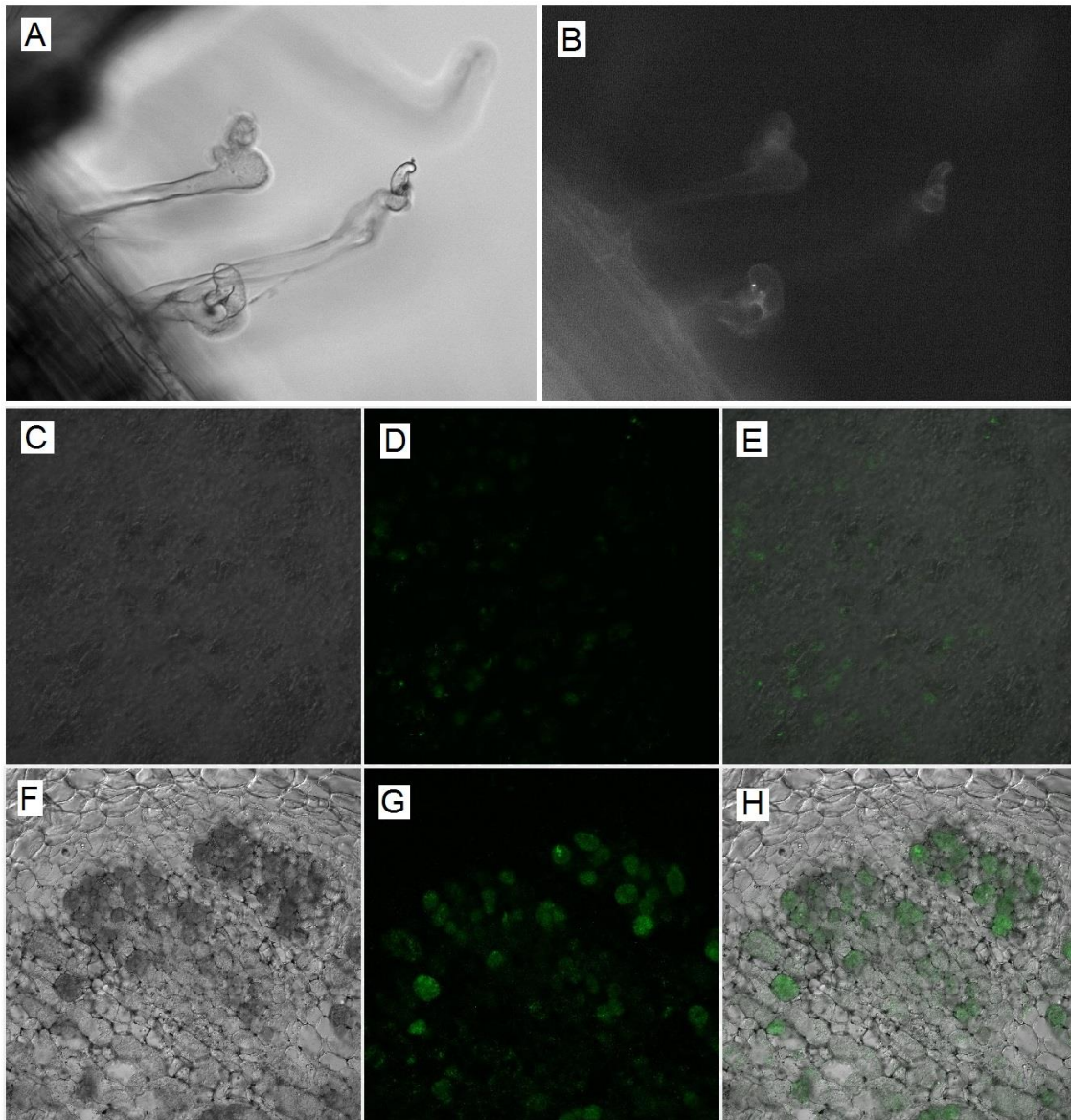


FIGURA 16 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB1).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB4

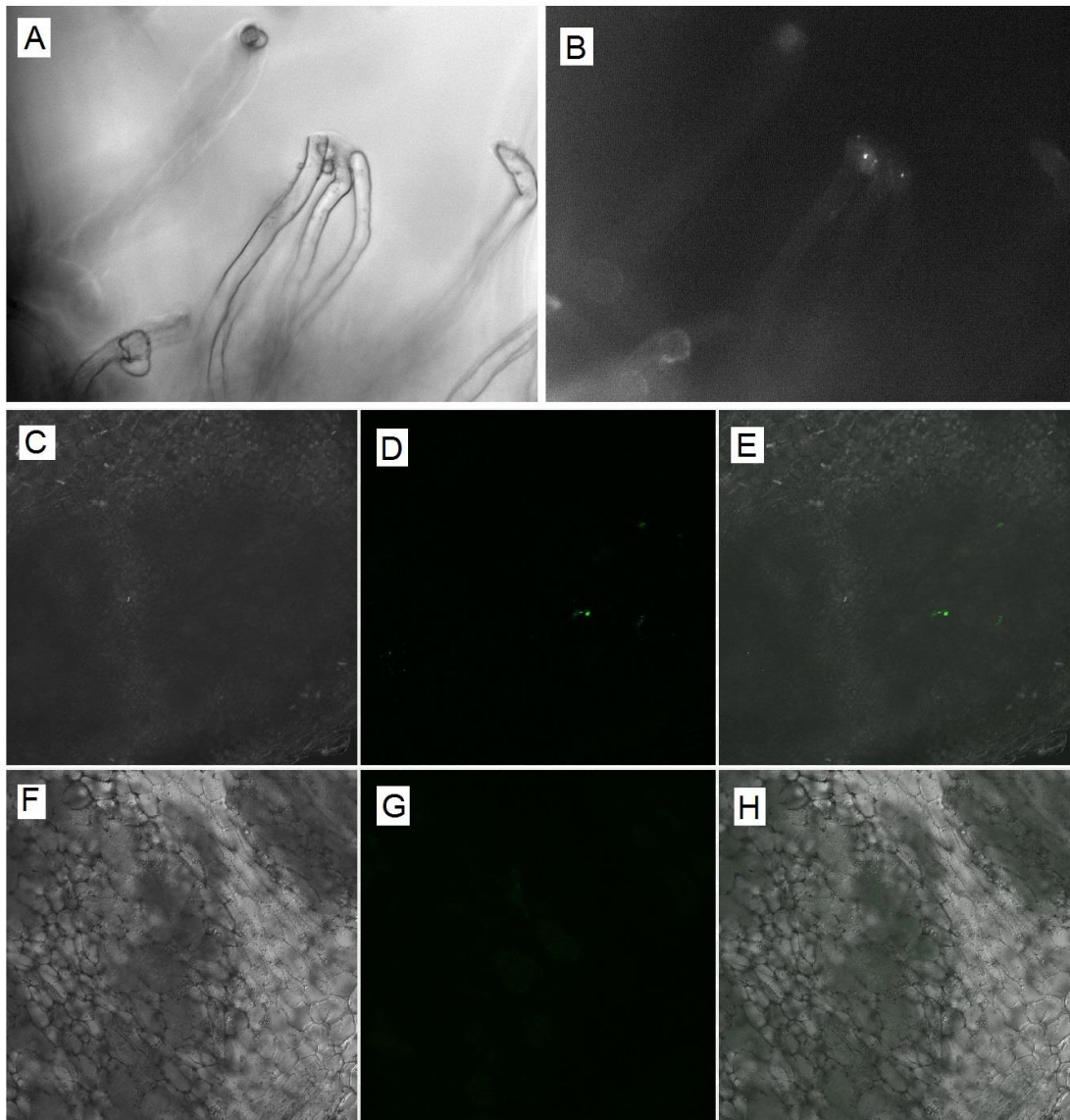


FIGURA 17 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB4).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB6

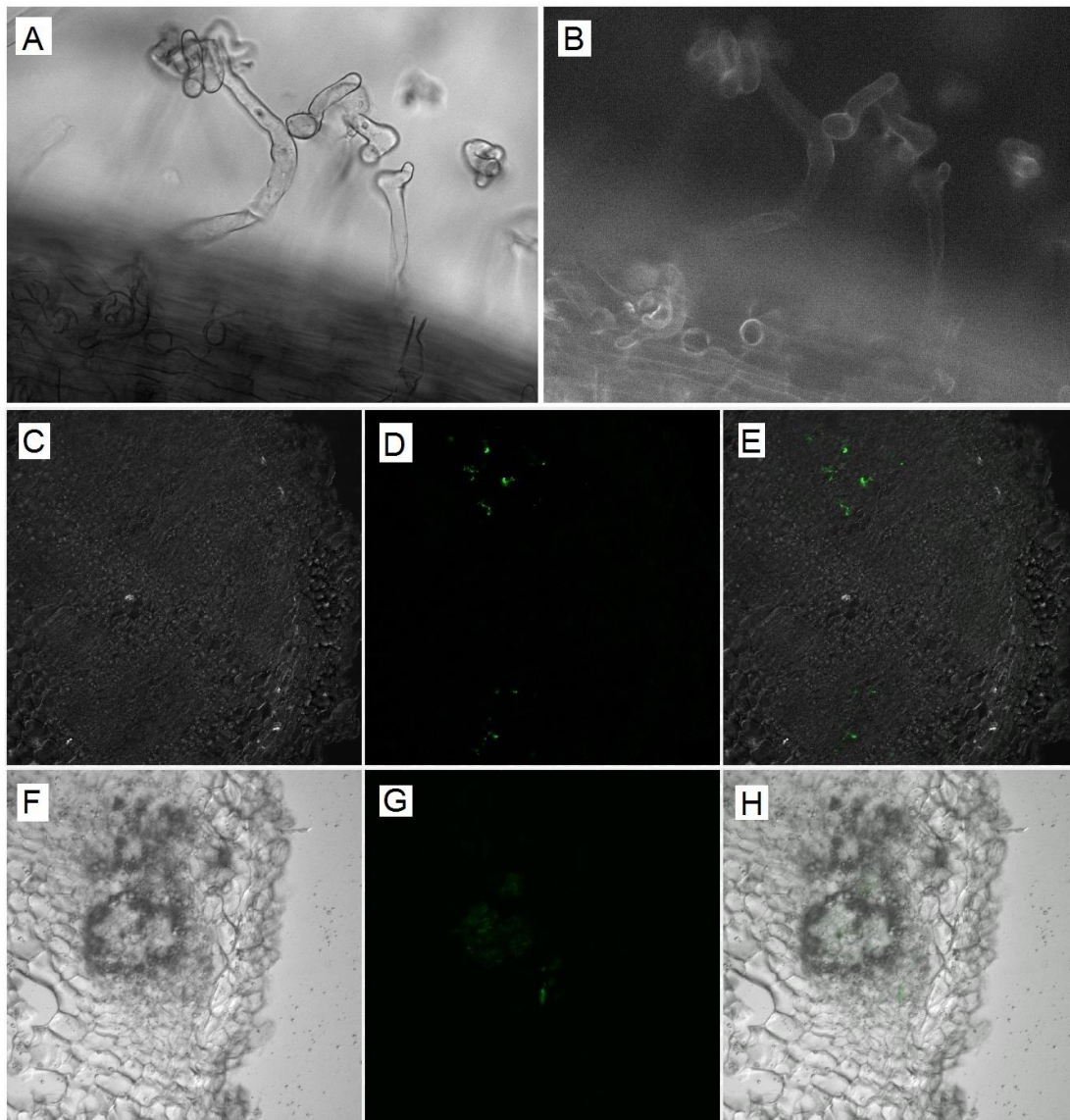


FIGURA 18 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB6).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB8

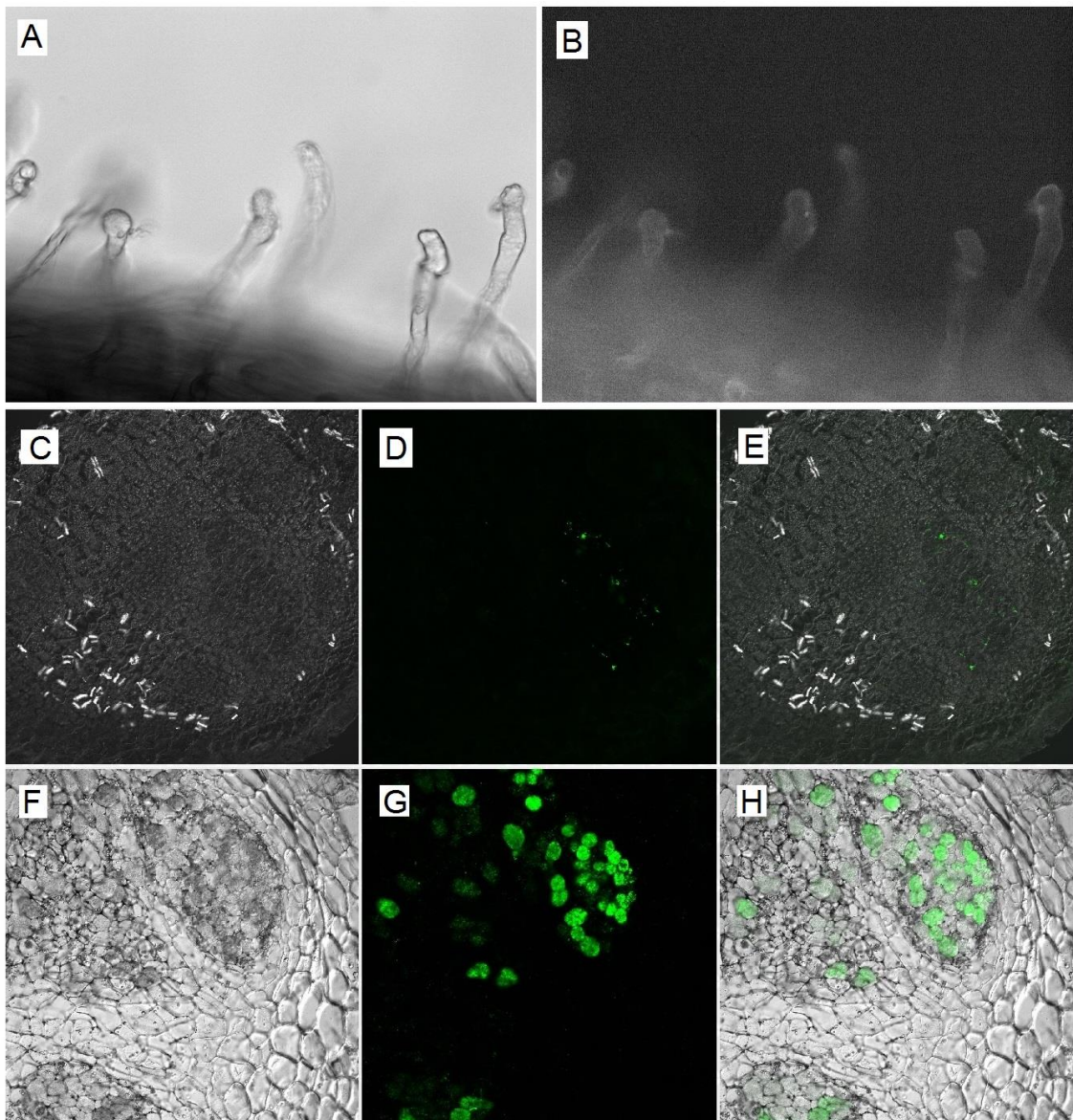


FIGURA 19 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT-TB8).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB9

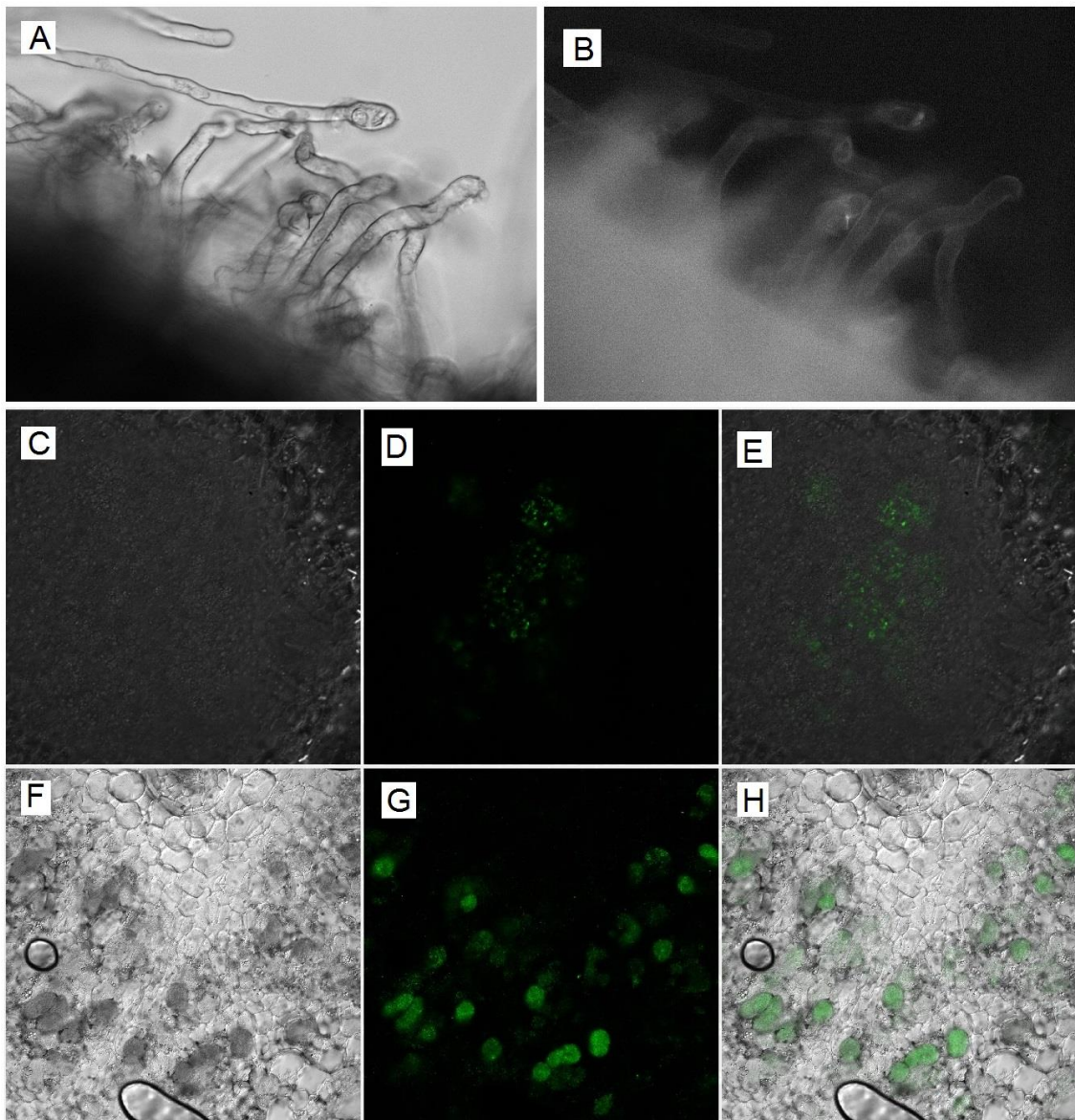


FIGURA 20 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT'-TB9).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

TB11

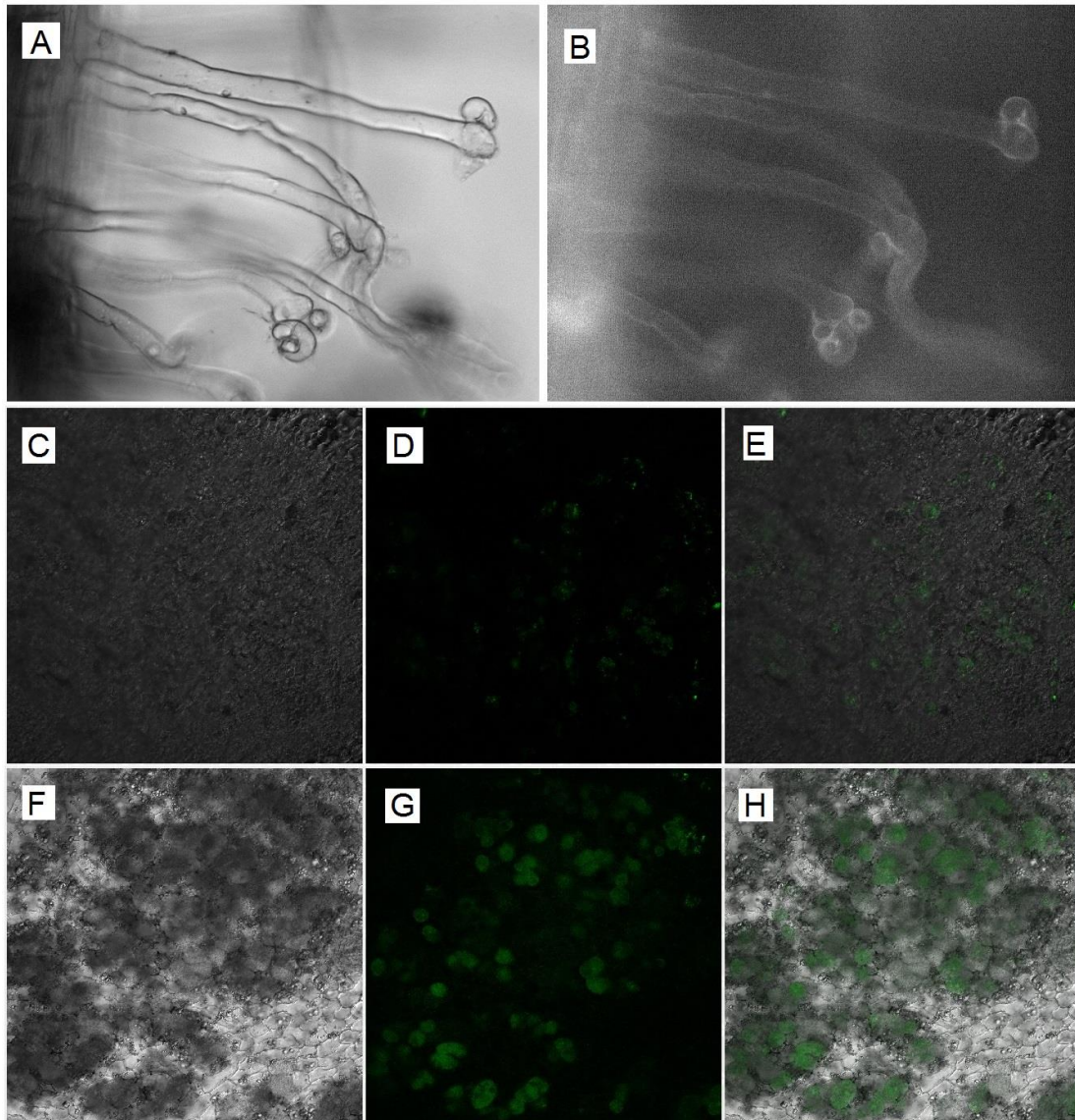


FIGURA 21 - CORTES TECIDUAIS DE *Phaseolus vulgaris* INFECTADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 (pGT'-TB11).

NOTA: Pelos radiculares – (A) Campo claro. (B) Fluorescência, sem coloração artificial. Nódulos primordiais – (C) Campo claro. (D) Fluorescência com filtro FITC. (E) Junção dos campos C e D. Nódulos maduros – (F) Campo claro. (G) Fluorescência com filtro FITC. (H) Junção dos campos F e G.

FONTE: O autor, 2016.

Os resultados obtidos através dos cálculos de intensidade de fluorescência em *P. vulgaris* comprovaram a diferença em relação aos níveis de expressão de GFP dos diferentes *tts-boxes* (FIGURA 22).

Os níveis de fluorescência foram mais intensos em: TB8, seguido por NB8, TB9, TB6, TB11, TB1 e TB4.

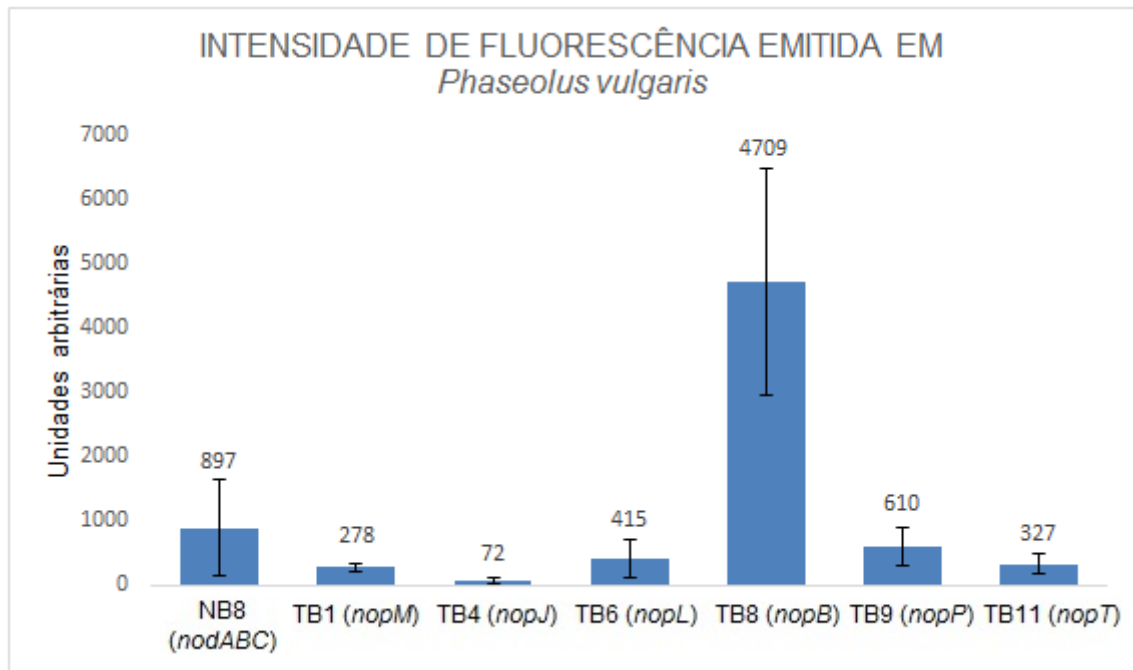


FIGURA 22 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM *Phaseolus vulgaris* COLONIZADO POR *Sinorhizobium fredii* NGR234 CONTENDO AS FUSÕES INDICADAS.

NOTA: Os valores representam as médias das intensidades de fluorescência emitida calculadas nos simbiossomos.

FONTE: O autor, 2016.

6 DISCUSSÃO

Conforme esperado, ocorreram infecção e colonização de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* por *S. fredii* NGR234 contendo as fusões em estudo. Genes *tts* quando ativados, por ligação de TtsI aos *tts-boxes*, desempenham um importante papel na infecção de plantas, por serem responsáveis pela expressão do TTSS e da produção de lipopolissacarídeos ricos em ramnose.

Conforme mostrado, os *tts-boxes* mais fortemente expressos em *V. unguiculata* foram: TB6, TB8, TB1, TB11, TB9 e TB4, respectivamente, enquanto em *P. vulgaris* foram: TB8, TB9, TB6, TB11, TB1 e TB4, respectivamente. Wassem (2008) mostrou,

através da atividade da β -galactosidase, que a maior ativação dos *tts-boxes* em NGR234, por indução via daidzeína, foram: TB8, TB4, TB9, TB1, TB6 e TB11, respectivamente. Wassem (2008) realizou seus experimentos *in vitro*, utilizando um único flavonóide para induzir expressão, sendo o único trabalho que descreve a expressão destes genes em NGR234. Como não havia dados na literatura mostrando como os *tts-boxes* se comportam *in vivo* foi realizado este trabalho com intuito de descobrir como estes são expressos durante a nodulação.

As diferenças de resultados deste trabalho quando comparados aos de Wassem sugerem que a intensidade da ativação dos *tts-boxes* em NGR234 é variável quando induzidos por diferentes flavonóides. A cascata regulatória proposta por Kobayashi (2004) evidencia que o sistema é dependente da ligação de flavonóides a NodD1 para que o processo seja desencadeado. Os resultados deste trabalho sugerem que os flavonóides produzidos e secretados por *V. unguiculata* e *P. vulgaris* interagem de maneira diferente com NodD1 em NGR234.

Diferentes níveis de expressão foram obtidos quando diferentes flavonóides foram utilizados em uma análise utilizando *nod-boxes* ao invés de *tts-boxes* (KOBAYASHI et. al., 2004). Os genes avaliados por estes autores também são alvos de NodD1/flavonóides e incluíram o *nod-box* 18, que controla a expressão de TtsI. Uma vez que TtsI é o ativador dos *tts-boxes*, os resultados descritos são coerentes com esta diferente capacidade de ativação de NodD1/flavonóides. Entretanto, não se sabe como diferentes *nod-boxes* são mais ou menos ativados por NodD1 em uma mesma condição, ou seja, em uma mesma célula, respondendo ao mesmo conjunto de flavonóides.

Uma vez que TtsI não responde diretamente a flavonóides, as diferenças observadas devem ter uma causa diferente ainda não identificada. Uma possível razão seria a diferente afinidade de TtsI por cada *tts-box* analisado. Nenhum estudo foi realizado para avaliar se a interação de TtsI com os *tts-boxes* é diferente em função da sequência de cada um deles. Uma sequência consenso (GTCAG-N₆-GaaAG) foi proposta para *tts-boxes*, em diversos rizóbios (KRAUSE et al., 2002) e esta está presente em todos os *tts-boxes* de NGR234. Entretanto, bases adjacentes não foram analisadas para avaliar se variações nestas determinam a afinidade pelo ativador. Além disso, o consenso é formado por uma repetição direta imperfeita e não se sabe se *tts-boxes* contendo a repetição perfeita (TB8 e TB9) são mais expressos que os imperfeitos.

7 CONCLUSÃO

Durante todos os estágios de desenvolvimento dos nódulos ocorreu emissão de fluorescência, confirmando que estes genes são expressos durante todo o processo.

Os níveis de expressão em nódulos maduros foram maiores que os vistos nos primórdios indicando que o TTSS é importante para a manutenção da colonização do nódulo.

Os *tts-boxes* mais fortemente expressos em *V. unguiculata* foram: TB6, TB8, TB1, TB11, TB9 e TB4, respectivamente, enquanto em *P. vulgaris* foram: TB8, TB9, TB6, TB11, TB1 e TB4, respectivamente.

REFERÊNCIAS

BERINGER, J. E. R **Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of general microbiology*, n. 84, p. 188-198, 1974.**

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

***Escherichia coli* DH10B**, disponível em <<<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent/dh10b-genotype.html>>> Acesso realizado na data 02/05/2016.

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

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

KAMBARA, K. **Regulation and Effects of the Type-three Secretion System of *Rhizobium* species NGR234. Tese n. 3967, 2008.**

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

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

LEWIN, A.; CERVANTES, E.; WONG, C.-H.; BROUGHTON, W. J. **nodSU, two new nod genes of the broad host range *Rhizobium* strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala***. *Molecular Plant Microbe Interact*, v. 3, p. 317–326, 1990.

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

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

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

MILLER, G.W.; LEVEAU, J. H.J.; LINDOW, S.E. **Improved gfp and inaZ Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors**. *MPMI*, v. 13, n. 11, p. 1243–1250, 2000.

OKE, V.; LONG, S. R. **Bacteroid Formation in the *Rhizobium*–Legume Symbiosis**. *Current Opinion in Microbiology*. v. 2, p. 641–646, 1999.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. **Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000.

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

RELIC, B.; TALMONT, F.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; PROMÉ, J. C.; BROUGHTON, W. J. **Biological Activity of Rhizobium sp. NGR234 Nod-factors on Macroptilium atropurpureum.** *MPMI*, v. 6, n. 6, p. 764-774, 1994.

RIDGE, R. W.; ROLFE, B. G. **Rhizobium Sp. Degradation of Legume Root Hair Cell Wall At The Site Of Infection Thread Origin.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, n. 3, p. 717–720, 1985.

RYLE, G. J. A.; POWELL, C. E.; GORDON, A.J. **The Respiratory Costs of Nitrogen Fixation in Soyabean, Cowpea, and White Clover: I. Nitrogen Fixation and the Respiration of the Nodulated Root.** *Journal of Experimental Bototany*, v.30, n.1, p: 135-144, 1979.

SALGADO, F. H. M.; SILVA, J.; OLIVEIRA, T. C.; BARROS, H. B.; PASSOS, N. G.; FIDELIS, R. R. **Eficiência de genótipos de feijoeiro em resposta à adubação nitrogenada.** *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 42, n. 4, p. 368-374, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edição, 1987.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. **A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria.** Nature Biotechnology, v. 1, p. 784 – 791, 1983.

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

WASSEM, R.; KOBAYASHI, H.; KAMBARA, K.; LE QUÉRE´, 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. v. 68, n. 3, p. 736–748, 2008.