

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA PIETROVSKI ROLÓN CÁCERES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E MUTAGÊNESE DE GENES ENVOLVIDOS NA
NODULAÇÃO DE *Sinorhizobium fredii NGR234*

CURITIBA

2023

JÚLIA PIETROVSKI ROLÓN CÁCERES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E MUTAGÊNESE DE GENES ENVOLVIDOS NA
NODULAÇÃO DE *Sinorhizobium fredii NGR234***

Monografia apresentada à disciplina
Estágio Supervisionado em Biologia
como requisito parcial à conclusão
do curso de Ciências Biológicas,
Centro Politécnico, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Ana Claudia Bonatto

CURITIBA

2023

RESUMO

A maior parte da atmosfera é formada por nitrogênio gasoso (N_2), o qual não pode ser assimilado pela maioria dos organismos. Apenas algumas bactérias e arqueas são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia (NH_3), e são conhecidos como diazotrofos. Dentre as bactérias diazotróficas, o grupo denominado de rizóbios, são capazes de realizar simbiose com plantas e induzir a formação de nódulos, tecidos especializados nos quais ocorre a quebra do dinitrogênio em amônia. Esse processo é conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e possui grande importância para a agricultura mundial. Devido ao gasto energético do processo, a FBN é regulada em vários níveis e depende da disponibilidade de amônio e oxigênio para as células. *Sinorhizobium fredii* NGR234 é um rizóbio capaz de realizar nodulação em mais de 112 gêneros de leguminosas, sendo a bactéria mais promiscua conhecida. As primeiras etapas da nodulação envolvem um processo de sinalização molecular entre a planta e o rizóbio. A planta secreta flavonoides que interagem com proteínas do rizóbio reguladoras de transcrição. O rizóbio, por sua vez, responde à planta com a produção de fatores Nod. Vários genes bacterianos estão envolvidos nesse processo, e muitos têm sua expressão regulada por flavonoides. O gene *y4aM* de NGR234, é um possível regulador transcricional e, em uma análise anterior, teve sua expressão detectada após a exposição de flavonoides. Outros genes identificados como possíveis reguladores transpcionais são os genes *mucR1* e *mucR2*, presentes no cromossomo e no plasmídeo simbótico, respectivamente. O produto desses genes ainda não possui função elucidada. Para avaliar a expressão gênica em resposta à flavonoides, os promotores dos genes *mucR2* e *y4aM* foram克隆ados no plasmídeo pPROBE contendo gene repórter GFP, sendo então avaliada a expressão de GFP em cultivos com e sem a adição de flavonoides. Os resultados sugerem que a expressão de ambos os genes é constitutiva, na ausência ou presença de flavonoides. O promotor do gene *mucR1* foi amplificado por PCR e inserido no plasmídeo de clonagem pTZ57R/T para futura clonagem no plasmídeo pPROBE. Além disso, uma construção do gene *y4aM* truncado no vetor pK18mobsacB, obtida em um trabalho anterior foi utilizada para a obtenção de uma estirpe mutante. A construção foi inserida em células de NGR234 e foi selecionada uma colônia simples recombinante, contendo o gene *y4aM* truncado e o gene completo. A partir de uma nova seleção com sacarose, foram obtidas colônias candidatas a duplo recombinante, contendo apenas a versão truncada do gene, que serão avaliadas fenotipicamente.

Palavras-chave: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *mucR*, *y4aM*, *flavonoides*

ABSTRACT

Most of the atmosphere is made up of gaseous nitrogen (N₂), which cannot be assimilated by most organisms. Only a few bacteria and archaea are able to reduce atmospheric nitrogen to ammonia (NH₃), and these are known as diazotrophs. Among the diazotrophic bacteria, the group known as rhizobia are capable of symbiosis with plants and induce the formation of nodules, specialized tissues in which dinitrogen is broken down into ammonia. This process is known as Biological Nitrogen Fixation (BNF) and is of great importance to agriculture worldwide. Due to the energy expenditure of the process, BNF is regulated at various levels and depends on the availability of ammonium and oxygen to the cells. *Sinorhizobium fredii* NGR234 is a rhizobium capable of nodulating more than 112 legume genera and is the most promiscuous bacterium known. The first stages of nodulation involve a process of molecular signaling between the plant and the rhizobium. The plant secretes flavonoids that interact with the rhizobium's transcription-regulating proteins. The rhizobium, in turn, responds to the plant by producing Nod factors. Several bacterial genes are involved in this process, and many have their expression regulated by flavonoids. The *y4aM* gene of NGR234 is a possible transcriptional regulator and, in a previous analysis, its expression was detected after exposure to flavonoids. Other genes identified as possible transcriptional regulators are the *mucR1* and *mucR2* genes, present in the chromosome and in the symbiotic plasmid, respectively. The product of these genes has yet to be elucidated. To evaluate gene expression in response to flavonoids, the promoters of the *mucR2* and *y4aM* genes were cloned into the pPROBE plasmid containing the GFP reporter gene, and GFP expression was then evaluated in cultures with and without the addition of flavonoids. The results suggest that the expression of both genes is constitutive, in the absence or presence of flavonoids. The *mucR1* gene promoter was amplified by PCR and inserted into the pTZ57R/T cloning plasmid for future cloning into the pPROBE plasmid. In addition, a construct of the *y4aM* gene truncated in the pK18mobsacB vector obtained in a previous study was used to obtain a mutant strain. The construct was inserted into NGR234 cells and a single recombinant colony containing the truncated *y4aM* gene and the complete gene was selected. From a new selection with sucrose, candidate double recombinant colonies were obtained, containing only the truncated version of the gene, which will be evaluated phenotypically.

Keywords: *Sinorhizobium fredii* NGR234, *mucR*, *y4aM*, *flavonoids*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por sempre me apoiarem e se importarem com minha educação, especialmente aos meus pais Vanderleia e Oscar .

Agradeço à minha orientadora Ana Claudia Bonatto, pela oportunidade, ensinamentos e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do LIPB (Laboratório de Interação Planta-Bactéria) por toda ajuda e amizade durante o período em que estive no laboratório.

A todos os amigos que me acompanharam durante a graduação, pelo carinho, paciência e por fazerem parte da minha vida.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DA CASCATA REGULATÓRIA EM RESPOSTA À FLAVONOIDES EM <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.....	14
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES <i>mucR2</i> E <i>y4aM</i> NO PLASMÍDEO SIMBIÓTICO DE NGR234.....	15
FIGURA 3 – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL pTZ57R/T.....	21
FIGURA 4 –GEL DE ELETROFORESE DE CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO FRAGMENTO CONTENDO O PROMOTOR DO GENE <i>mucR1</i>	26
FIGURA 5 –CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DA REGIÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>mucR2</i> NO PLASMÍDEO pPROBE-GT.....	27
FIGURA 6 – CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO PROMOTOR <i>y4aM</i> NO PLASMÍDEO pPROBE-GT’.....	28
FIGURA 7 –GRÁFICO INDICANDO OS VALORES DE LEITURA DE GFP PARA O GENE <i>y4aM</i>	28
FIGURA 8 –GRÁFICO INDICANDO OS VALORES DAS LEITURAS DE GFP PARA O GENE <i>mucR2</i>	30
FIGURA 9 – GEL DE ELETROFORESE DE PCR DE CONFIRMAÇÃO DE SIMPLES RECOMBINANTE.....	31
FIGURA 10 – GEL DE ELETROFORESE DE PCR DE CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>y4aM</i> TRUNCADO.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	18
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	10
2.2. <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.....	11
2.3. Interação Planta-Bactéria.....	12
2.4. Genes <i>y4aM</i> , <i>mucR2</i> e <i>mucR1</i>	14
2.5 Justificativa.....	17
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivos gerais.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Estirpes e plasmídeos.....	18
4.2. Condições de cultivo.....	19
4.3. Extração de DNA cromossomal de <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.....	19
4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
4.4.1. Amplificação de clonagem da região promotora do gene <i>mucR1</i>	20
4.5. Sequenciamento.....	21
4.6. Eletroforese em gel de agarose.....	22
4.7. Preparo de células para conjugação/termocompetentes.....	22
4.8. Transformação através de choque térmico.....	22
4.9. Extração de DNA plasmidial.....	23
4.10. Clonagem no plasmídeo pPROBE-GT e pPROBE-GT'.....	23
4.11. Transformação em <i>E. coli</i> S17.1.....	24
4.12. Conjugação em NGR234.....	24
4.13. Avaliação de expressão de GFP.....	24
4.14. Obtenção da estirpe mutante <i>y4aM</i> - de <i>S. fredii</i> NGR234.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Clonagem do gene <i>mucR1</i>	26
5.2. Clonagem dos genes <i>mucR2</i> e <i>y4aM</i> nos plasmídeos de fusão GT/GT'.....	27
5.3. Ensaios de leitura de GFP.....	28
5.4. Obtenção de mutante <i>y4aM</i> - simples recombinante.....	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante na biomassa celular e o principal componente da atmosfera, onde está presente em sua forma inerte de dinitrogênio (N_2), e para ser assimilado pelos organismos precisa passar pelo processo de transformação em amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-). Os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação, essenciais para a vida, são controlados principalmente por microrganismos (Stein & Klotz, 2016).

A fixação de nitrogênio pode ser realizada industrialmente pelo método Harber-Bosch, porém o processo traz prejuízos ambientais devido à emissão de carbono durante o processo e necessidade de alto gasto energético (Cherkasov *et al.*, 2015). Embora tenha quadruplicado a produtividade agrícola, o advento do método Haber-Bosch levou à uma degradação natural sem precedentes (Stein & Klotz, 2016).

Sendo o nitrogênio um dos principais fatores determinantes para a produtividade agrícola (Sinclair & Rufty, 2012), são utilizados fertilizantes nitrogenados, que podem apresentar desperdício de até 50% e riscos de intoxicação de organismos por lixiviação (Ahmed *et al.*, 2017). O nitrogênio desperdiçado não consumido pode passar por escoamento, contaminando o solo e causando eutrofização em sistemas aquáticos. Rockstrom e colaboradores (2023) propuseram quantidades seguras em toneladas de nitrogênio a serem excedidas na agricultura, sendo esse um dos limites planetários já ultrapassados para os limites de segurança na Terra: são desperdiçados 119 Tg de nitrogênio ativo ao ano.

A redução do nitrogênio em amônia, forma que pode ser assimilada pelos organismos, também ocorre no processo denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), que é realizado por microrganismos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, denominados diazotrofos, sendo assim capazes de utilizar N_2 atmosférico como fonte de nitrogênio (Smith, 2002). Os rizóbios são organismos diazotrofos que realizam simbiose com leguminosas pertencentes à família Fabaceae, conhecidas pela sua capacidade de acumular aminoácidos, compondo cultivares de importância econômica e alimentícia como soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*) e amendoim (*Arachis hypogaea*) (Shamseldin & Velázquez, 2020). A compreensão da regulação genética

destes processos é fundamental para o aumento da utilização de microrganismos como biofertilizantes e estabelecimento de uma agricultura sustentável.

Sinorhizobium fredii NGR234 é o rizóbio com a maior diversidade de hospedeiros simbióticos conhecida (Poole *et al.*, 2018; Krysciak *et al.*, 2014), sendo assim organismo modelo no estudo da nodulação. O estudo da expressão gênica e mutagênese de genes possivelmente envolvidos no processo de nodulação e fixação de nitrogênio em NGR234 pode ajudar a elucidar duas funções na cascata regulatória.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio

O elemento químico nitrogênio é indispensável para a vida, devido a sua presença em ácidos nucleicos, proteínas e aminoácidos (Novoa & Oomis, 1981). Em temperatura ambiente, está disponível na sua forma gasosa de dinitrogênio (N_2), compondo 80% do gás atmosférico. No entanto, esta forma não pode ser consumida diretamente pelos organismos; e este elemento representa um fator limitante no crescimento dos vegetais (Santi *et al.*, 2013). Para suprir essa necessidade na agricultura são utilizados fertilizantes nitrogenados, produzidos pelo processo de Harber-Bosch, no qual são requeridas condições de alta pressão e temperatura elevada (Hungria *et al.*, 1997). A produção desses fertilizantes corresponde a até 1% da energia total gasta no planeta, requerendo petróleo e compondo um processo poluente e de alto custo (Smith, 2002).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) se trata da redução de N_2 a NH_3 em temperatura ambiente por microrganismos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, denominados diazotrofos (Dixon & Kahn, 2004). A FBN apresenta menores implicações ao ambiente pois o nitrogênio é utilizado *in situ*, diminuindo o risco de lixiviação (Dixon & Kahn, 2004). A maior parte do nitrogênio disponível na biosfera é provido por meio da fixação por microrganismos e o nitrogênio proveniente da FBN é suficiente para manter a demanda em alguns cultivares específicos (Dobereiner *et al.*, 2000, Poole *et al.*, 2018).

O processo de quebra da tripla ligação entre os átomos de nitrogênio é realizado pela metaloenzima nitrogenase, que possui dois componentes: o componente dímero menor, um doador de elétrons dependente de ATP chamado de proteína de Ferro (Fe) e o componente heterotetramérico ferro-molibdênio (MoFe), que contém o sítio catalítico (Dixon & Kahn, 2004). Alguns rizóbios são capazes de reduzir nitrogênio atmosférico em vida livre, porém o processo é mais eficaz em tecidos especializados das plantas denominados nódulos, onde existe menor presença de oxigênio, que inativa permanentemente a nitrogenase (Poole *et al.*, 2018). Devido à sensibilidade do processo ao oxigênio e sua demanda energética, a fixação é altamente regulada por mecanismos genéticos.

Os diazotrofos (bactérias fixadoras de nitrogênio) podem ser de vida livre, associativos ou simbióticos (Evans & Burris, 1998). Entre os diazotrofos simbióticos, um grupo de bactérias promove a formação de um órgão especializado nas raízes das plantas hospedeiras (leguminosas) para a fixação de nitrogênio, o nódulo. Estas bactérias são chamadas de noduladoras ou também de rizóbios, pois incluem espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, entre outros (Geurts; Fedorova; Bisseling, 2005). Essas bactérias são capazes de infectar as células da planta hospedeira e induzir a formação de nódulos, nos quais ocorre fixação e transferência de nitrogênio (Loh & Stacey, 2003). Alguns aspectos que caracterizam um nódulo são a introdução de um novo meristema que envolve células do córtex da raiz, infecção do tecido por rizóbios, desenvolvimento de tecido central com anoxia e presença de tecido vascular periférico envolvendo o tecido infectado (Brewin, 1991). Diferentes rizóbios e hospedeiros iniciam o processo de formação de nódulos, no entanto, poucas associações simbióticas são realmente compatíveis e atingem a formação do nódulo maduro (Perret *et al.*, 1999).

2.2. *Sinorhizobium fredii* NGR234

Sinorhizobium fredii NGR234 é uma alfabactéria gram negativa, que possui capacidade de nodular 112 gêneros de leguminosas e também a não leguminosa *Parasponia andersonii* (Trinick, 1980; Pueppke & Broughton, 1999). Devido a sua grande variedade de hospedeiros conhecida, seu genoma é amplamente estudado (Krysciak *et al.*, 2014). O genoma de *S. fredii* NGR234 possui

três replicons, sendo eles o cromossomo com 3,925,702 pb, um megaplasmídeo denominado pNGR234b com 2,430,033 pb, e o plasmídeo pNGR234a, denominado plasmídeo simbótico, no qual estão presentes a maior parte dos genes envolvidos no processo de simbiose e fixação de nitrogênio (Schmeisser; Liesegang; Krysciak, 2009). No plasmídeo simbótico também são encontrados genes envolvidos no transporte de elétrons para a ferrodoxina, regulador *nifA* e os genes estruturais da nitrogenase *nifHDK* (Schmeisser *et al.*, 2009; Palacios & Newton, 2005).

A capacidade de nodulação promíscua de NGR234 ainda não é totalmente compreendida. Alguns fatores são apontados como fundamentais, como a diversidade de fatores específicos Nod que produz, sendo que a proteína NodD1 é capaz de regular 18 *nod-boxes* presentes em NGR234, e a secreção de diversas proteínas Nop (Proteínas externas de nodulação) pelo sistema T3SS (Broughton, Jabbouri, Perret, 2000; Marie, *et al.*, 2003; Perret *et al.*, 1999; Marie, *et al.*, 2004), (Kobayashi *et al.*, 2004).

No processo de nodulação por *S. fredii* NGR234, a proteína NodD1, capaz de interagir com diferentes tipos de flavonoides, ativa a expressão de genes *nod-box*, sequências conservadas envolvidas no processo de nodulação. Nesse conjunto de genes estão incluídos genes *nod*, *nol*, *noe* (envolvidos na síntese de fatores Nod) e genes envolvidos na síntese polissacarídeos de membrana que também participam do processo de reconhecimento planta-bactéria (Perret *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2004).

2.3. Interação Planta-Bactéria

Durante o processo de simbiose de rizóbios e plantas hospedeira, a formação de nódulos maduros e compatíveis com a fixação de nitrogênio depende de várias etapas de troca de sinais moleculares entre os organismos envolvidos. Uma das primeiras etapas da sinalização molecular que ocorre entre legumes e rizóbios é a secreção de flavonóides pela planta, que interagem com proteínas dos rizóbios que atuam como reguladores transpcionais (Deakin & Broughton, 2009). A proteína NodD é a mais comum entre os rizóbios, e dependendo da espécie pode reconhecer diferentes flavonoides; uma vez que o complexo é formado, a proteína NodD ativa a transcrição de vários genes, incluindo os conjuntos *nod*, *nol* e *noe* (Perret *et al.*, 1999; Kobayashi, *et al.*, 2004). Os produtos destes genes, principalmente dos genes

nodA, *nodB* e *nodC*, são responsáveis pela síntese dos fatores Nod (Broughton, Jabbouri, Perret, 2000). Estes fatores são lipo-quito-oligossacarídeos (LCO) que são detectados pelos receptores LysM das plantas, iniciando o processo de interação que leva à deformação da raiz para iniciar o processo de infecção (Poole et al., 2018).

Os fatores Nod desencadeiam o processo de infecção e induzem a deformação dos pelos radiculares, dando origem à estrutura tubular do cordão de infecção (Jones et al., 2007). Fatores Nod apresentam importante papel na nodulação, uma vez que mutações em seus genes resultam em nodulação inferior ou ausência de nodulação (Geurts; Fedorova; Bisseling, 2005). Em NGR234 há também um cluster de genes que codifica para um sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), um sistema responsável pelo transporte de efetores do citoplasma da bactéria para o citoplasma da planta (Poole et al., 2018). A transcrição dos genes T3SS também está sob a regulação de NodD1 e, portanto, é dependente da presença de flavonoides (Broughton, Jabbouri, Perret, 2000; Viprey, et al., 1998).

Um esquema da cascata regulatória em resposta à flavonoides, regulada pela proteína NodD1 de NGR234 foi proposto por Kobayashi e colaboradores (2004) (Figura 1). Em NGR234, a proteína NodD1, pertencente à família de reguladores transacionais LysR, é dependente de flavonoides e atua como um ativador de loci com sequências *nod-boxes* em seus promotores. Além disso, NodD1 induz a transcrição dos genes *ttsl* e *syrM2*, que estão presentes no plasmídeo simbiótico e codificam fatores de transcrição (Kobayashi et al., 2004). O regulador Ttsl é responsável pela ativação da transcrição de genes do sistema T3SS, incluindo as proteínas NopL, NopT, NopJ, NopM e NopP, que são transportadas para o citoplasma da planta hospedeira (Corinne et al., 2003). A proteína SyrM2, por sua vez, regula sequências presentes no plasmídeo simbiótico denominadas *syr-boxes*; e regula também a expressão da proteína NodD2, responsável pela ativação de *nod-boxes* de resposta tardia à flavonoides, atuando assim como sinalizador da cascata regulatória (Kobayashi et al., 2004).

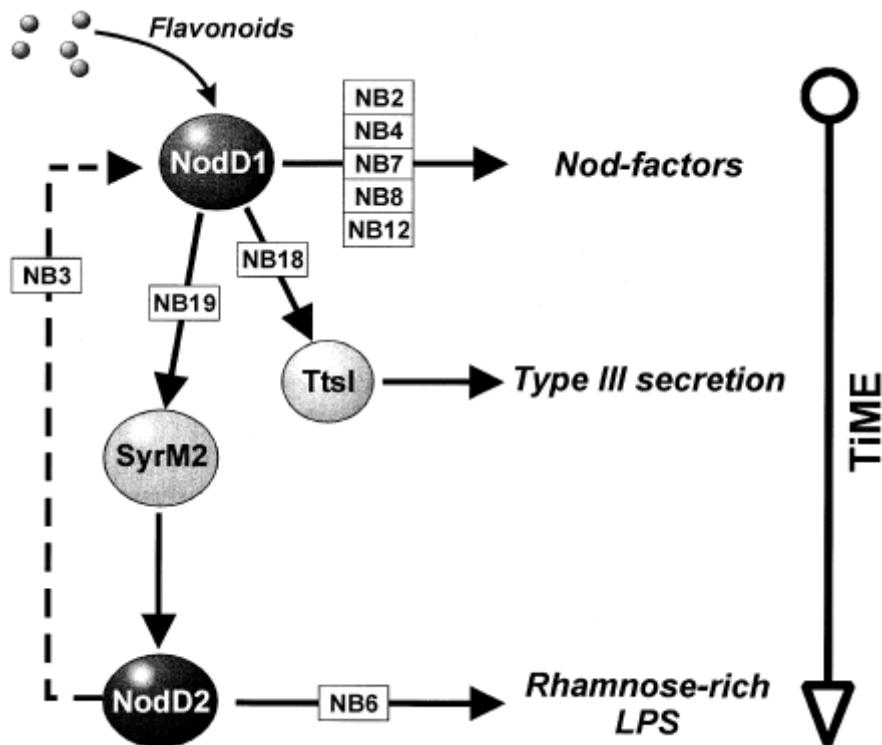


Figura 1: Esquema da cascata regulatória em resposta à flavonoides em *Sinorhizobium fredii* NGR234. Linhas contínuas indicam atividade de ativação, enquanto que linhas tracejadas indicam atividade de repressão. NB: sequências nod-box. Flavonoides interagem com o regulador transcrecional NodD1, que regula sequências NB. Também são ativados os reguladores transcrecionais TtsI, que regula genes envolvidos no T3SS, e SyrM2, regulador transcrecional envolvido na resposta tardia à flavonoides. Fonte: Kobayashi *et al.* (2004).

Após serem envolvidos por uma membrana simbiótica, os rizóbios se diferenciam em bacteroides e passam a expressar genes *nif* e *fix*, que codificam enzimas necessárias especificamente para o processo de fixação de nitrogênio. Os genes *nif* são regulados por proteínas do tipo NifA, que são reguladas pelos níveis de oxigênio e nitrogênio (Dixon & Khan, 2004). A partir daí forma-se uma simbiose na qual a planta fornece carbono e energia na forma de ácidos dicarboxílicos, e os bacteroides secretam amônia, metabolizada pela planta na síntese de aminoácidos (Poole *et al.*, 2018).

2.4. Genes *y4aM*, *mucR2* e *mucR1*

Os genes *y4aM* e *mucR2* estão localizados no plasmídeo simbótico de NGR234, a jusante do gene *nodD1* (Figura 2). O gene *y4aM* possivelmente compõe um operon com os genes *syrB* e *y4aO*. No estudo de Perret *et al.* (1999), foi observada expressão de *y4aM* entre 1 e 24 horas após a indução com o flavonoide daidzeína. Análises de sequência sugerem que pode se tratar de um regulador

transcricional da família Cro/Cl, porém ainda sem função elucidada. Reguladores transcrpcionais dessa família possuem uma região N-terminal, na qual está localizada o domínio de ligação ao DNA e uma possível região de dimerização associada à região C-terminal (Luscombe *et al.*, 2000).

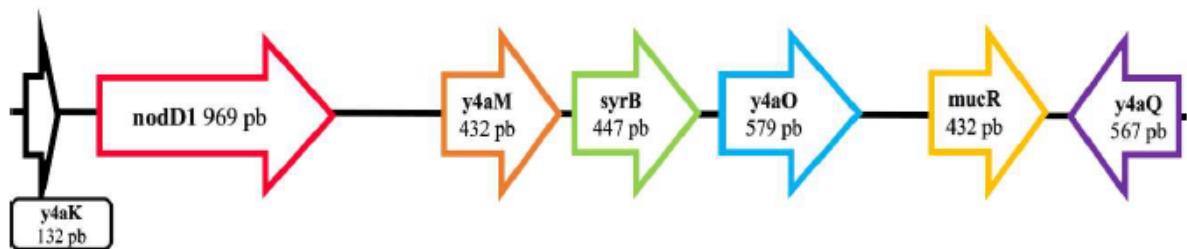


Figura 2: Representação esquemática dos genes *mucR2* e *y4aM* no plasmídeo simbótico de NGR234. Fonte: OLIVEIRA, 2022.

Em NGR234 o gene *mucR2* também está inserido no plasmídeo simbótico, aparentemente é monocistrônico e se trata de um regulador transcricional. Assim como outros rizóbios, NGR234 possui um segundo gene *mucR*, localizado no cromossomo, denominado *mucR1*.

Em *Sinorhizobium meliloti*, a proteína MucR parece estar envolvida na regulação de genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos, que são essenciais para a nodulação (Keller *et al.*, 1995). A proteína MucR de *S. meliloti* regula diretamente o gene *ndvA* e se liga ao DNA sem necessariamente requerer uma sequência consenso (Slapakova *et al.*, 2023).

Jiao e Tian (2020) sugeriram que a proteína MucR, conservada em alfa-proteobactérias, pode apresentar similaridades com proteínas do tipo silenciador xenogênico, reprimindo genes advindos de transferência horizontal ao se ligar em regiões ricas em sítios AT. Proteínas dessa família possuem uma região N-terminal associada à oligomerização e C-terminal associada com ligação ao DNA. Posteriormente o gene *mucR1* de *S. fredii* CCBAU45436 foi identificado como possível regulador transcricional pleiotrópico de genes envolvidos na adaptação ao estresse e simbiose, e possui participação na formação de colônias mucóides e capazes de fixar nitrogênio (Jiao *et al.*, 2022).

Em *S. fredii* HH103, a deleção do gene *mucR1* levou à diminuição na síntese de exopolissacarídeos e da capacidade de fixação de nitrogênio em duas espécies

hospedeiras; sendo, nesse organismo, identificado como gene participante no processo de nodulação e pode possuir diferentes efeitos que variam de acordo com o hospedeiro (Acosta-Jurado *et al.*, 2016). Os autores também identificaram que MucR regula centenas de genes na ausência e na presença de flavonoides, sendo alguns deles relacionados ao grupo *nod* e a produção de exopolissacarídeos.

No estudo de Jiao e colaboradores (2016), foi observado que, em *Sinorhizobium fredii* CCBAU45436, o gene *mucR2* presente no plasmídeo simbótico carrega uma mutação de mudança de fase de leitura e não é funcional, e o produto do gene *mucR1*, presente no cromossomo, é essencial no processo de fixação de nitrogênio. Os autores sugerem que o ativador transcrecional MucR1 atua na regulação de genes envolvidos na síntese de transportadores iônicos de alta afinidade, importantes para o funcionamento da nitrogenase. Em *S. fredii* NGR234, o gene *mucR2* não possui a mutação presente em CCBAU45436. A função dos genes *mucR1*, localizado no cromossomo, e *mucR2*, localizado no plasmídeo simbótico de NGR234 ainda não foram estudadas, e os papéis de seus produtos nos processos de nodulação/fixação de nitrogênio não foram estabelecidos.

A secreção de flavonóides pelas raízes da planta hospedeira é a primeira etapa de sinalização molecular no processo de simbiose. Por estarem próximos a genes envolvidos no processo de nodulação e ainda não possuírem sua função elucidada na cascata regulatória, a avaliação da expressão dos genes *mucR2*, *mucR1* e *y4aM* em resposta a flavonóides é importante para a compreensão de sua função. Além disso, a obtenção de uma estirpe mutante de NGR234 com o gene *y4aM* truncado pode contribuir para a compreensão de sua função, através de estudos de genética funcional.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, os promotores dos genes *y4aM* e *mucR2* de *S. fredii* NGR234 foram amplificados a partir do DNA cromossomal e clonados no plasmídeo de clonagem pTZ57R/T. Neste trabalho, foi também realizada a clonagem da região promotora do gene *mucR1* no pTZ57R/T. Em seguida os promotores foram extraídos do plasmídeos de clonagem e inseridos em vetor de fusão pPROBE contendo gene repórter GFP, com o objetivo de analisar a atividade do promotor através de leitura de excitação de GFP.

Para avaliação da função do gene *y4aM*, objetiva-se obter uma estirpe com deleção na parte central do gene. Para isso será utilizada uma construção do gene

y4am contendo deleção em fase na parte central inserida no vetor suicida pK18, que foi obtida em outros trabalhos, e será utilizada para induzir dupla recombinação que leva a deleção no gene.

2.5 Justificativa

A anotação do genoma de *S. fredii* NGR234 descreve os genes *y4aM*, *mucR1* e *mucR2* como prováveis reguladores transcricionais. Como a resposta à flavonoides é a etapa inicial da sinalização da simbiose planta-bactéria, identificar se esses genes são expressos em resposta a flavonoides é importante para a compreensão de sua função. Além disso, a deleção em fase do gene *y4aM* deve permitir estudos da sua função através da avaliação do fenótipo da estirpe mutante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a expressão dos genes *y4aM*, *mucR1* e *mucR2* de *S. fredii* NGR234 em resposta à presença de flavonóides e obter uma estirpe mutante com deleção em fase no gene *y4aM*.

3.2 Objetivos específicos

- Amplificação e clonagem da região promotora do gene *mucR1* em vetor de expressão;
- Clonagem dos promotores dos genes *y4aM*, *mucR1* e *mucR2* em plasmídeo sem promotor contendo gene repórter GFP (*green fluorescent protein* - proteína fluorescente verde) pPROBE-GT e/ou pPROBE-GT';
- Conjugação dos plasmídeos contendo os promotores em células de *Sinorhizobium fredii* NGR234;
- Avaliação da expressão dos genes *y4aM*, *mucR1* e *mucR2* por meio de avaliação da expressão de GFP em cultivo de NGR234 com presença de flavonóides adicionados ao meio de cultura;
- Obtenção de uma estirpe de NGR234 mutante no gene *y4aM* duplo recombinante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estirpes e plasmídeos

As estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho se encontram listados na Tabela 1, sendo apresentados os genótipos relevantes para esse trabalho.

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.

ESTIRPES/PLASMÍDEOS	GENÓTIPO/FENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F-mrcA ΔΦ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ/ <i>lacX74</i> <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> Δ(<i>ra</i> / <i>leu</i>)7697 <i>araD139</i> <i>galUga1</i> <i>KnupGrpsL</i> - λ	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>tmp</i> ^R , <i>spc</i> ^R , <i>str</i> ^R , <i>rec</i> ^A , <i>pro</i> , <i>hsd</i> ^R , RP4-2-Tc::Mu - Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	Rif ^R , derivado do tipo selvagem de NGR234	Trinick, 1980
pPROBE-GT	Gm ^R (gene de resistência à gentamicina), vetor com gene repórter GFP sem promotor	Miller, Leveau, Lindow, 2000
pPROBE-GT'	Gm ^R , vetor com gene repórter GFP sem promotor	Miller, Leveau, Lindow, 2000
pTZ57R/T	Amp ^R (gene de resistência à ampicilina), vetor de clonagem	FERMENTAS
pTZ57R/T- <i>pmucR2</i>	Amp ^R , vetor contendo promotor do gene <i>mucR2</i>	Chukevik, 2022
pTZ57R/T-py4aM	Amp ^R , vetor contendo promotor do gene <i>y4aM</i>	Oliveira, 2022
pTZ57R/T- <i>pmucR1</i>	Amp ^R , vetor contendo promotor do gene <i>mucR2</i>	Este trabalho
pPROBE-GT/ <i>pmucR2</i>	Gm ^R , contendo promotor do gene <i>mucR2</i> em vetor expressando GFP	Este trabalho
pPROBE-GT'/py4aM	Gm ^R , contendo promotor do gene <i>y4aM</i> em vetor expressando GFP	Este trabalho

pK18/Lig1+2

Km^R, *sacB*, *lacZa*, fragmento
contendo o gene *y4aM* truncado

Tozatto, 2023

FONTE: A autora (2023).

4.2. Condições de cultivo

Células de *Escherichia coli* de estirpe DH10B ou S17.1 foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) e Luria Bertani Agar (LA) (Sambrook *et al.*, 1989) em temperatura de 37°C por até 20 horas, sendo posteriormente mantidas em glicerol a depender da finalidade. As estirpes de *Sinorhizobium fredii* NGR234 foram cultivadas em meio triptona-levedura (TY) (Broughton *et al.*, 1986) na temperatura de 28°C, de um a dois dias. Foram acrescidos aos meios de cultura os antibióticos adequados, sendo eles: ampicilina (Amp) 250 µg/mL, gentamicina (Gm) 15 µg/mL e rifampicina (Rif) 50-100 µg/mL. Para a seleção de duplos recombinantes, foi utilizada sacarose 2%.

4.3. Extração de DNA cromossomal de *Sinorhizobium fredii* NGR234

Para extração do DNA genômico de *S. fredii*, foram coletados 1,5mL de cultura de células com um dia de incubação a 28°C em meio líquido TY, e centrifugados durante 1 minuto a 14000rpm. Houve o descarte do sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em tampão GET, sendo acrescidos 1 µL de enzima RNase. Foram acrescidos 10 µL de lisozima em concentração 10mg/mL às amostras, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida as células foram lisadas por meio de adição de 400 µL de solução de lise (2,56 mL H₂O + 300 µL SDS 10% + 120µL tris-acetato 40 nM pH 7,8 + 20µL acetato de sódio 20 nM + 6µL EDTA 1 nM); e realizado acréscimo de 165 µL de NaCl 5M em cada amostra, e em seguida de 200 µL de solução fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (na proporção 25:24:1), sendo então a amostra submetida a agitação suave para homogeneização. Centrifugou-se as amostras a 14000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e foram então realizadas duas etapas seguidas de adição de 50 µL de solução fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos estéreis, de capacidade de 0,5 mL, e foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto para 2/3

de volume de acetato de amônio 7,5M em cada amostra, que foi então novamente centrifugada por 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante, e foi então realizada lavagem com 800 µL de etanol 80%. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos e então passaram por secagem, sendo então ressuspensas em 100 µL de água ultrapura.

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA cromossomal obtido foi utilizado na reação de amplificação de DNA por meio de cadeia da polimerase (PCR). A reação de foi realizada por meio da adição de 14,2 µL de água ultrapura, tampão adequado para a enzima, DNA molde, 1,2 µL de MgCl₂ 1,5 mM, enzima Taq DNA polimerase, dNTPs e 10 pmol de cada primer. O programa utilizado apresenta uma etapa inicial de desnaturação da dupla fita a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, etapa entre 56 a 58°C (a depender dos primers) por 30 segundos e, finalmente, 72°C por 45 segundos, com uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

4.4.1. Amplificação de clonagem da região promotora do gene *mucR1*

A região promotora do gene *mucR1* foi amplificada a partir do DNA cromossomal de NGR234 selvagem por meio de PCR, utilizando os seguintes primers: mucR1F1for: 5'-TTGGCGGCATTCTGATTCTGT-3'; mucR1F1rev 5'-TTGTTGAGGATCCACTCGAC-3', sendo realizada a confirmação da amplificação através de eletroforese em gel de agarose. Após a confirmação, o fragmento foi clonado no vetor de clonagem pTZ57R/T (esquematizado na Figura 3). O plasmídeo pTZ57R/T possui timinas nas extremidades 5', formando pontas coesivas que podem se ligar a terminais 3' com adeninas presentes nos fragmentos de DNA provenientes de amplificação por Taq polimerase.

Os fragmentos obtidos por amplificação foram submetidos à reação de ligação com o vetor pela enzima T4 DNA ligase, em temperatura ambiente por 24 horas, e posteriormente sendo realizada transformação em *E. coli* DH10B, sendo utilizado como marcador de seleção o antibiótico ampicilina (150 µg/mL).. O DNA plasmidial das colônias foi submetido a reação de restrição e eletroforese para confirmação da presença do inserto, e então submetidos a reação de sequenciamento para determinar a orientação e integridade do fragmento.

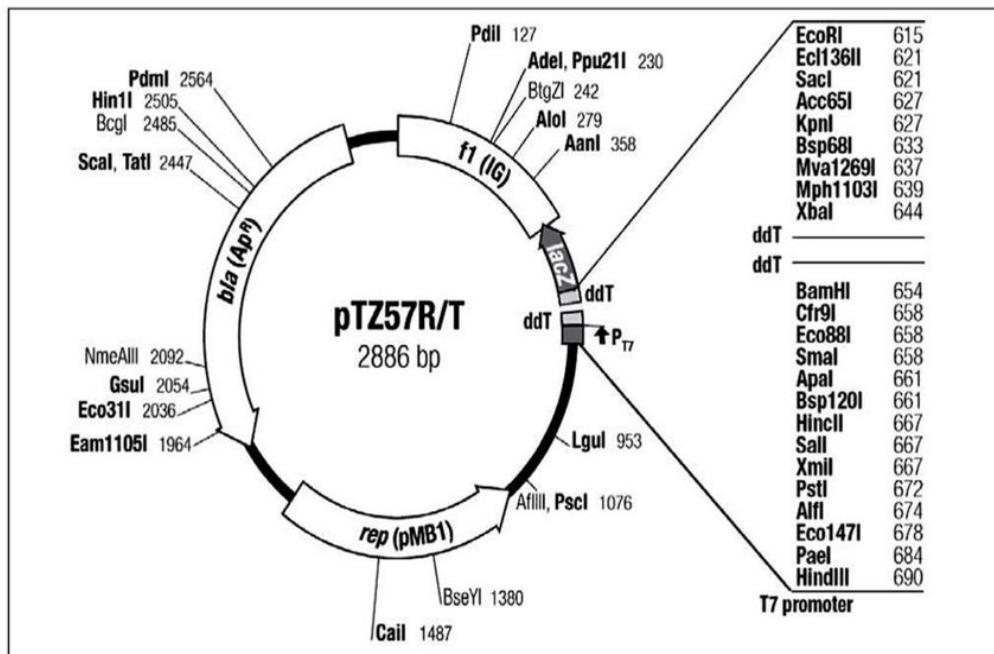


Figura 3: Mapa do vetor plasmidial pTZ57R/T. Fonte: Thermo Fisher Scientific(2016).

4.5. Sequenciamento

A reação de sequenciamento do fragmento amplificado por PCR contendo o promotor do gene *mucR1* foi realizada em sistemas de 10 µL, contendo aproximadamente 100 ng de DNA molde obtido a partir de PCR, tampão BigDye, mixBigDye, 10 pmol dos primers complementares ao vetor pTZ57R/T e água ultrapura para completar o volume final. A reação foi realizada no termociclador com programa de etapa inicial de desnaturação a 96°C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de: 96°C por 15 segundos para desnaturação, etapa de anelamento dos primers a 50°C e etapa de extensão a 60°C por 4 minutos.

Para purificação, a reação recebeu o acréscimo de 10 µL de água ultrapura e 2 µL de acetato de amônio 7,5 M. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de etanol absoluto na reação, que permaneceram na bancada por 5 minutos para então passar por centrifugação por 20 minutos. Em seguida descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 500 µL de etanol 70%, passando por nova centrifugação por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e a amostra passou por processo de secagem no escuro. As amostras foram sequenciadas no aparelho 3500XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). O resultado do sequenciamento foi então avaliado no software BioEdit (Hall, 1999), para garantir que não houvessem

mutações na sequência decorrentes do processo de amplificação por PCR e confirmar a orientação do fragmento no plasmídeo pTZ57R/T.

4.6. Eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA foram avaliadas em eletroforese utilizando gel de agarose 0,8% corrido em tampão TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2mM). Em seguida, o gel foi corado por meio de imersão em solução contendo brometo de etídeo em concentração 0,5 µg/mL durante aproximadamente 30 minutos e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e foto documentador acoplado (Cell Biosciences).

4.7. Preparo de células para conjugação/termocompetentes

Foi realizado um pré-inóculo de *E. coli* DH10B ou S17.1 em 5 mL de meio LB e mantido a 37°C *overnight*. No dia seguinte, 800µL da cultura foram reinoculados em 80 mL de meio SOB (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) e mantidos em shaker a 37°C até que se atingiu a D.O.₆₀₀ de 0,4. Em seguida a cultura foi distribuída em tubos de 50mL para centrifuga estéreis e mantida em banho de gelo por 10 minutos, para então passar por centrifugação a 4°C a 5000 rpm por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 15mL de MgCl₂ 100mM. Em seguida foi realizada novamente centrifugação a 4°C, descarte do sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 25 mL de CaCl₂ 100 mM, sendo mantido em gelo durante 20 minutos. Após a última etapa de centrifugação refrigerada e descarte do sobrenadante, foram acrescentados 800µL de CaCl₂ com glicerol em 20%. As amostras foram então distribuídas em alíquotas de 100µL e armazenadas em freezer a -80°C.

4.8. Transformação através de choque térmico

Células *E. coli* DH10B ou S17.1. termocompetentes foram descongeladas em banho de gelo, e receberam 2 µL de DNA proveniente de reação de ligação, sendo mantidas no gelo por 20 minutos. Em seguida foram submetidas a choque térmico a 42°C por 2 minutos, sendo então devolvidas ao gelo por 2 minutos. Em seguida

acresceu-se 400 µL de meio LB e a cultura foi levada a estufa, onde foi mantida a 37°C durante uma hora. Foram então inoculados 180µL desse cultivo em placas contendo meio LA e antibiótico adequado, que foram mantidas a 37°C por 20 horas para seleção de transformantes; e posteriormente armazenadas em geladeira a 4°C.

4.9. Extração de DNA plasmidial

Após transformação com os plasmídeos de interesse pPROBE ou pTZ57R/T, células *E. coli* DH10B foram cultivadas em meio LB por 16 horas a 37°C. Foram centrifugados, a 14500 rpm, 1,5 mL de cultivo, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. As células foram resuspensas em 150 µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCL pH 8,0 25 mM) com a utilização de um agitador tipo vórtex. As células foram lisadas com adição de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M) e mantidas na bancada durante 5 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL de KacF (Acetato de potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8) e mantidos sob banho de gelo por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizados em vórtex, sendo então realizada centrifugação por 10 minutos e transferência do sobrenadante para um tubo novo. O DNA foi então precipitado com a utilização de etanol absoluto (100%) e centrifugação, e lavado com etanol 80% e centrifugação durante 5 minutos; após processo de secagem o DNA foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura.

4.10. Clonagem no plasmídeo pPROBE-GT e pPROBE-GT'

Os plasmídeos PROBE-GT e pPROBE-GT' foram extraídos de *E. coli* DH10B/pPROBE-GT ou pPROBE-GT' por meio de extração de DNA plasmidial e clivados com enzimas de restrição. Os promotores dos genes *mucR1* (item 4.4.1.), *mucR2* e *y4aM* (OLIVEIRA, 2022) clonados no vetor pTZ57R/T foram submetidos a reação de digestão enzimática, sendo mantidas em tampão adequado por 3 horas em temperatura de 37°C. Para a clonagem do promotor do gene *mucR2* no plasmídeo pPROBE-GT foram utilizadas as enzimas *Hind*III e *Sall*; o promotor de *y4aM* foi clonado no pPROBE-GT' utilizando *Eco*RI e *Hind*III; e para o gene *mucR1* foram utilizadas as enzimas *Sac*I e *Hind*III e o vetor pPROBE-GT'.

Após precipitação utilizando etanol e centrifugação, realizou-se reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase. As reações de ligação foram transformadas em *E. coli* DH10B e as colônias obtidas foram avaliadas através da extração de DNA plasmidial e clivagem com enzimas de restrição. A presença dos fragmentos de interesse foi confirmada por meio de digestão enzimática e eletroforese.

4.11. Transformação em *E. coli* S17.1

Após a confirmação da presença dos promotores dos genes nos plasmídeos pPROBE, esses foram utilizados para transformação por choque térmico em *E. coli* S17.1, estirpe própria para conjugação bacteriana com NGR234. As colônias que receberem o plasmídeo foram selecionadas por resistência à gentamicina 15 µg/L.

4.12. Conjugação em NGR234

Para conjugação, foram cultivadas células *E. coli* S17.1 contendo plasmídeo pPROBE em meio LA com adição de gentamicina 15 µg/L a 37°C, enquanto que *S. fredii* NGR234 foram cultivadas em meio TY com adição de rifampicina 50 µg/L a 28°C. Em seguida as duas estirpes foram cultivadas juntas em placa de Petri contendo ambos os meios TY e LA misturados em 28°C. Em seguida, para a seleção de células contendo o plasmídeo de fusão pPROBE, o cultivo foi inoculado em placa contendo meio TY e os antibióticos gentamicina 15 µg/L e rifampicina 100 µg/L, sendo mantido em estufa a 28°C entre dois a três dias.

4.13. Avaliação de expressão de GFP

Para realização da leitura de GFP, colônias de *S. fredii* NGR234 contendo os plasmídeos pPROBE-GT'/py4aM, pPROBE-GT/pmucR2 e pPROBE-GT' sem promotor foram crescidas em triplicata em 3mL de meio TY líquido com Gentamicina 15 µg/L por 2 dias a 28°C. Então 50 µl foram reinoculados em 5mL de RMS padrão (meio mínimo para rizóbios, com succinato a 12mM como fonte de carbono - composição em Somasegaram & Hoben, 1994) com adição de antibióticos. No dia seguinte, a concentração celular foi verificada através de leitura no aparelho

SynergyLX (BioTek – Agilent), no comprimento de onda de 600 nm, determinando a quantidade a ser reinoculada. Em seguida, as culturas foram reinoculadas em 5 mL de meio RMS padrão com amônio e 5 mL de meio RMS com adição de mix de flavonoides (apigenina 0,2 µM, crisina 0,2 µM, genisteína 0,2 µM, kampferol 0,2 µM e naringenina 0,2 µM), sem antibióticos. As leituras foram realizadas em triplicata após 24 horas nos comprimentos de onda 485 nm (pico de excitação da GFP), 528 nm (pico de emissão da GFP) e 600 nm. (verificação do crescimento celular). Os valores da expressão de GFP foram obtidos pela razão da leitura de GFP pela D.O.₆₀₀ da cultura. Será comparada a leitura de cada gene na ausência e na presença de flavonoides.

4.14. Obtenção da estirpe mutante *y4aM*- de *S. fredii* NGR234

Em um trabalho anterior foi obtida uma construção contendo o gene *y4aM* de *S. fredii* NGR234 truncado, com deleção da região central do gene, inserido no vetor pK18mobSac (Tozatto, 2023). O plasmídeo não possui origem de replicação reconhecida por NGR234, e possui genes de resistência à canamicina e *sacB* que fazem com que a bactéria seja sensível à sacarose. Para que os genes sejam expressos, é necessária a inserção completa do plasmídeo no genoma, em um primeiro evento de recombinação. Este plasmídeo foi transformado em *E. coli* S17, e posteriormente transformado em NGR234 por conjugação.

Células que sofreram simples recombinação foram selecionadas em meio contendo o antibiótico canamicina a 50 µg/mL. As células simples recombinantes contêm a inserção completa do plasmídeo pK18/Lig1+2 em seu genoma. Estas células foram cultivadas em meio líquido e a seleção de células duplo-recombinantes foi feita em placas contendo meio de cultivo TY com sacarose 5%. Após o segundo evento de recombinação o plasmídeo deve sair do genoma levando a cópia do gene completa e deixando apenas a cópia truncada. Estas células devem ser resistentes à sacarose e sensíveis à canamicina, uma vez que os genes *sacB* (que conferem sensibilidade à sacarose) e de resistência à canamicina são perdidos com o plasmídeo. Para confirmar que as células perderam a resistência à canamicina, as colônias foram cultivadas em placas espelho, com e sem o antibiótico.

Foi realizada extração de DNA cromossomal das estirpes obtidas por seleção por dupla recombinação. A confirmação da presença apenas do gene truncado nas células obtidas foi confirmada através de PCR. Foram utilizados os primers NGR-350-Mut1 5'TGAATGAGATCtGCAAGGTC-3' e NGR-350-Mut4 5'TTCGATACCTCGAgCAAACC-3' (Oliveira, 2022) e o DNA genômico das colônias selvagem, simples e candidatas a duplo recombinantes, para determinação do tamanho do gene.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clonagem do gene *mucR1*

Para posterior clonagem no plasmídeo pPROBE-GT' e análise da expressão gênica, o gene *mucR1* foi amplificado por meio de PCR e inserido no plasmídeo pTZ57R/T, dando assim origem ao plasmídeo pTZ57R/T-mucR1F1. Para confirmação do inserto foi realizada reação de restrição enzimática utilizando *SacI* e *HindIII* e avaliação em gel de eletroforese (Figura 4), mostrando a presença de um fragmento de aproximadamente 445 pb correspondente ao inserto. A clonagem do gene no plasmídeo pPROBE-GT' ainda não foi concluída.

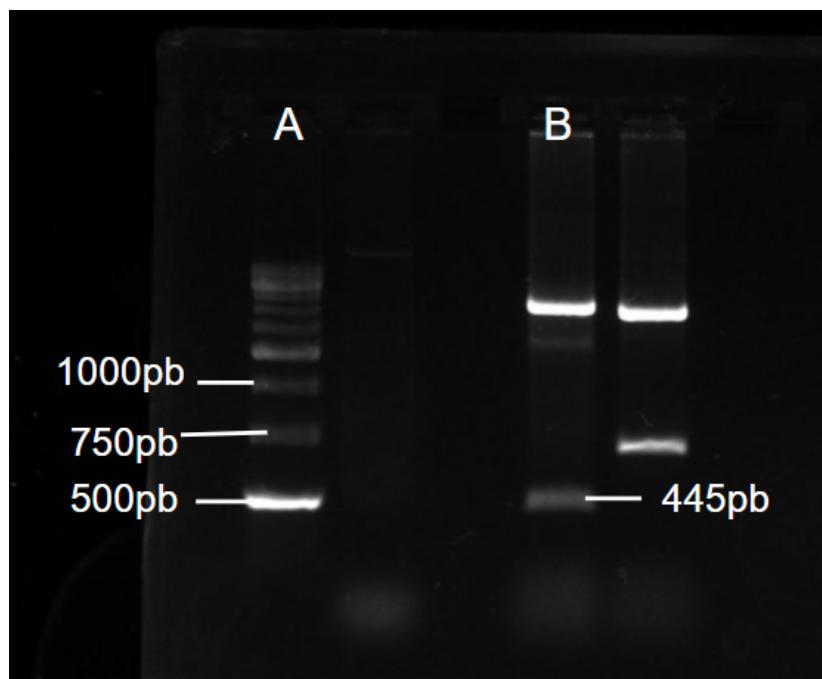


Figura 4: Gel de eletroforese de confirmação de inserção do fragmento contendo o promotor do gene *mucR1*: A- Marcador 1Kb (Fermentas), B-. Restrição do plasmídeo pTZ57R/T contendo o inserto correspondente à região promotora do *mucR1* Fonte: A autora, 2023.

5.2. Clonagem dos genes *mucR2* e *y4aM* nos plasmídeos de fusão GT/GT'

A região promotora dos genes *mucR2* e *y4aM* foram clivadas dos plasmídeos pTZ57R/T-*pmucR2* e pTZ57R/T-*py4aM* e inseridos nos vetores pProbeGT e pProbeGT', respectivamente. Os plasmídeos obtidos foram denominados ProbeGT/*mucR2* e pProbeGT'/*y4aM*. Foi realizada digestão enzimática para confirmar a presença dos insertos, sendo observados fragmentos contendo o tamanho esperado para os promotores dos genes de interesse, que podem ser observados nas Figuras 5 e 6.

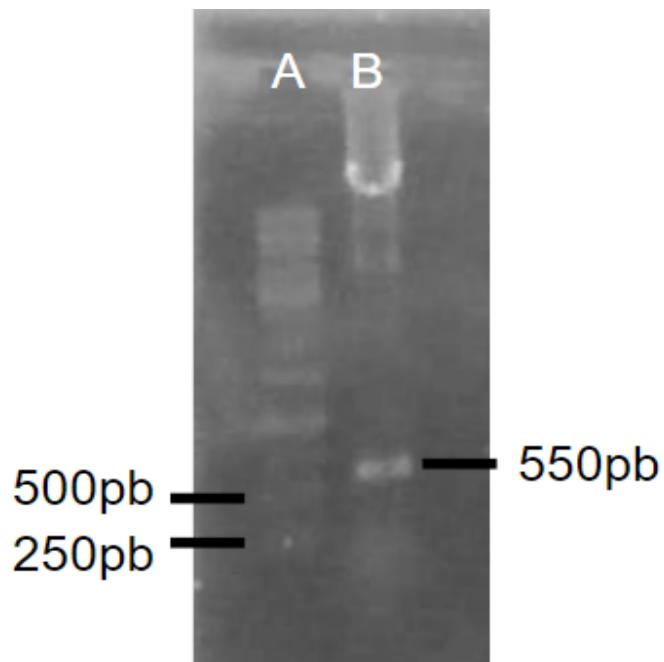


Figura 5: Confirmação da inserção da região do promotor do gene *mucR2* no plasmídeo pPROBE-GT: Linha A - Marcador 1Kb (Fermentas); B - Clone contendo o fragmento de interesse de 550pb. Fonte: A autora (2023).

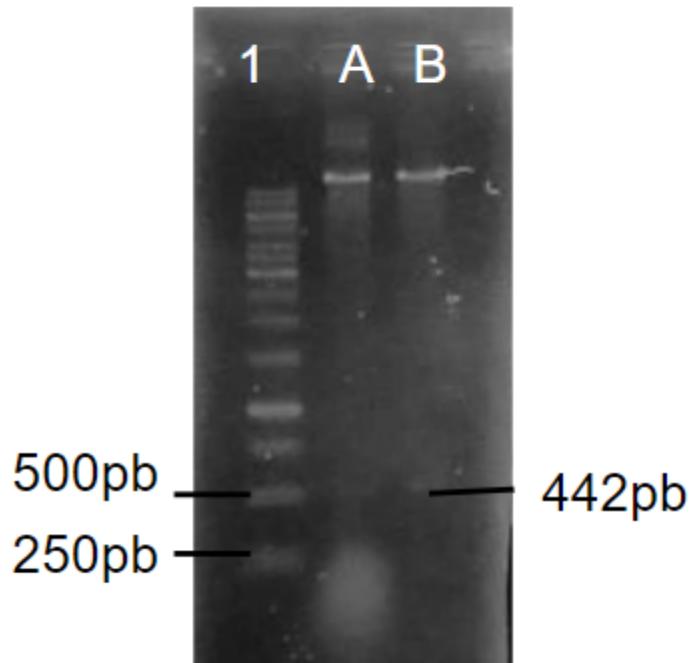


Figura 6: Confirmação da inserção do promotor *y4aM* no plasmídeo pPROBE-GT': Linha 1 - Marcador 1Kb (Fermentas), linhas A e B: pPROBE-GT' contendo o inserto de interesse de 442pb. Fonte: A autora (2023).

5.3. Ensaios de leitura de GFP

Para verificar a resposta dos genes *y4aM* e *mucR2* à flavonoides, sua região promotora foi clonada no plasmídeo de fusão pPROBE, e foi avaliada a expressão de GFP em condições de cultivo com e sem adição de flavonoides. Foram realizadas leituras após 24 horas de incubação. Como controle negativo, foi realizada leitura de linhagem contendo o plasmídeo pPROBE-GT' fechado sem a presença de promotor, que não apresentou expressão de GFP. A expressão de GFP a partir da construção contendo o promotor do gene *y4aM* foi observada na presença e ausência de flavonoides. Os valores de expressão não apresentaram diferença significativa entre os meios de cultivo com ou sem adição de flavonoides (teste T, valor de $p=0.7495$), sugerindo que o gene apresenta expressão constitutiva, e os resultados podem ser Os gráficos contendo os valores de GFP / D.O.₆₀₀ podem ser observados a seguir,na Figura 7.

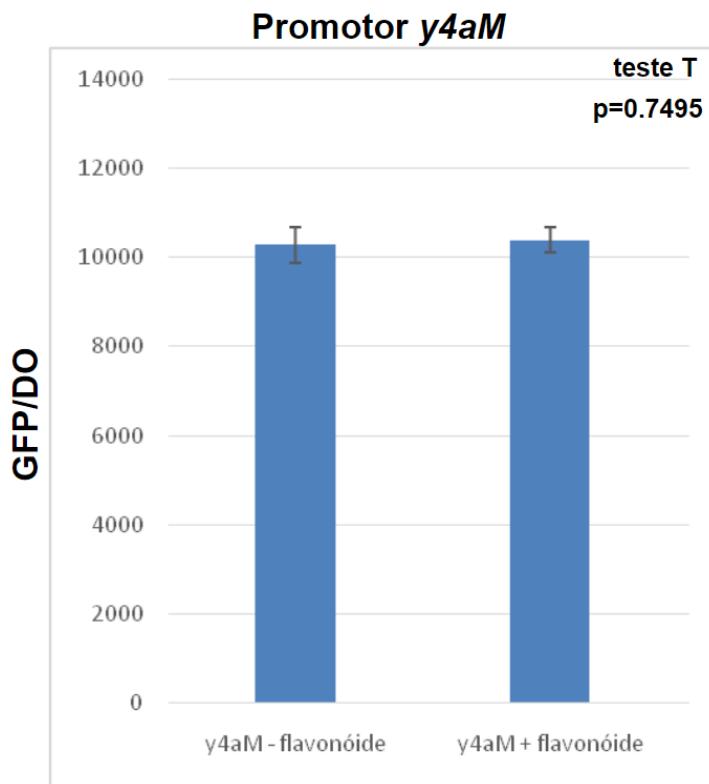


Figura 7: Gráfico indicando os valores das leituras de GFP para o promotor *y4aM*: sendo apontado na esquerda a condição sem flavonoides e na direita com adição de flavonoides foi realizado teste T, com valor de p=0.7495. Fonte: A autora (2023).

As linhagens contendo o promotor do gene *mucR2* também apresentaram expressão de GFP nas duas condições testadas. No entanto, para este promotor os valores apresentaram diferença significativa (teste T, valor de p=0.0001881), sugerindo que o gene possui expressão menor em meio contendo flavonoides. Os gráficos contendo os valores de GFP / D.O.₆₀₀ para o promotor *mucR2* podem ser observados na Figura 8.

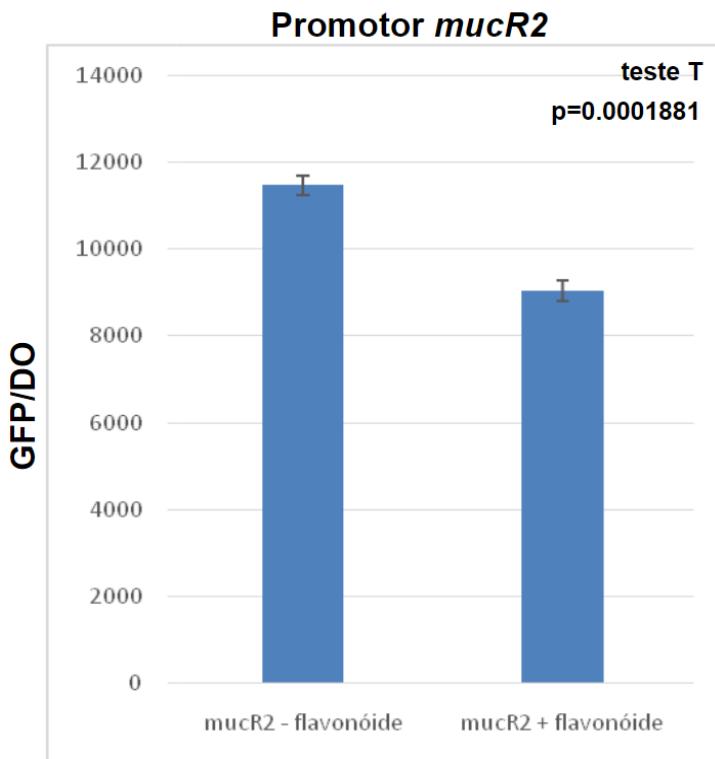


Figura 8: Gráfico indicando os valores das leituras de GFP para o promotor do gene *mucR2*: indicados na esquerda valores na ausência de flavonoides e na direita com a presença de flavonoides, foi realizado teste T, com valor de p=0.0001881. Fonte: A autora (2023).

Ambos os resultados são contrários ao observado por Perret *et al.*, 1999. No caso do trabalho anterior, fragmentos do plasmídeo simbótico foram utilizados como sonda para identificar a expressão de mRNAs por hibridização. Alguns destes fragmentos podiam conter regiões de mais de um gene. Portanto, é possível que a expressão observada por Perret e colaboradores após a indução por flavonoides seja de genes vizinhos. Sendo o gene *mucR2* regulador transcripcional em outras estirpes de *Sinorhizobium fredii* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2022) e envolvido na nodulação, são necessários mais estudos para compreender sua possível repressão diante de flavonoides, e os efeitos em genes que podem ser alvo de regulação.

5.4. Obtenção de mutante *y4aM* simples recombinante

Para estudos sobre a função do gene *y4aM*, foi obtida anteriormente no nosso grupo uma construção contendo o gene truncado. Este plasmídeo que foi inserido em células de *Sinorhizobium fredii* NGR234 por conjugação. Inicialmente foi

obtido um mutante simples recombinante, que foi avaliado por PCR para confirmação da presença do gene truncado e do gene completo, sendo utilizados os primers NGR-350-Mut1 e NGR-350-Mut4. Por conta na deleção na parte central do gene truncado, este apresenta tamanho menor que o gene selvagem, sendo assim visualizado na Figura 9.

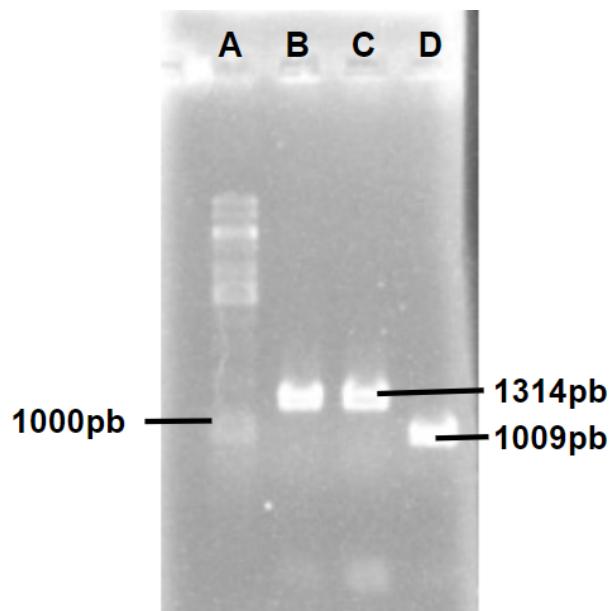


Figura 9: Gel de eletroforese de PCR de confirmação de simples recombinante. A - Marcador 1Kb (Fermentas), B e C - Colônias contendo o gene *y4aM* selvagem, com tamanho de 1314 pb, D - Colônia com o gene truncado, de 1009 pb. Fonte: A autora (2023).

Após confirmação de estirpe simples recombinante, foi realizado cultivo na presença de sacarose para selecionar duplo recombinantes. Foram obtidas três colônias candidatas, que passarão por procedimentos para confirmação, sendo identificadas na Figura 10.

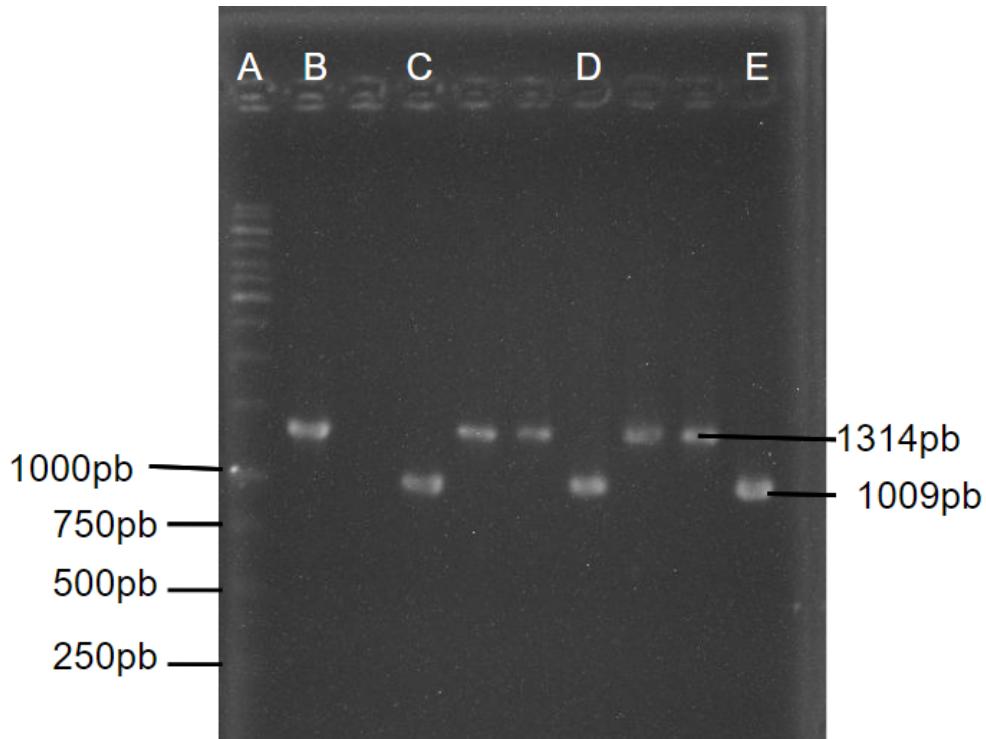


Figura 10: Gel de agarose de PCR de confirmação da presença do gene *y4aM* truncado. A- Marcador 1Kb (Fermentas), B - PCR amplificada a partir de NGR234 selvagem contendo o gene com tamanho de 1314 pb, C, D e E - PCR amplificada de possíveis duplo recombinantes, apresentando o gene *y4aM* truncado. Fonte: A autora (2023).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das tentativas de clonagem, ainda não foi possível obter o plasmídeo pPROBE-GT' contendo o fragmento com o promotor do gene *mucR1*. Atividades futuras envolvem a clonagem da região promotora do gene *mucR1* no plasmídeo e realização dos ensaios de GFP para análise da expressão gênica.

O gene *y4aM* não apresentou diferença significativa de leitura de GFP entre as condições de cultivo com e sem flavonoides, sugerindo que este gene tenha constitutiva. O gene *mucR2* apresentou diferença significativa entre as condições de cultivo, indicando que possivelmente o gene é reprimido em resposta a flavonoides. Devido a dificuldades na amplificação dos fragmentos presentes no mutante *y4aM* simples recombinante, não foi possível confirmar o restante dos mutantes ou iniciar a avaliação fenotípica das linhagens. No entanto, foi obtida uma colônia simples recombinante e três candidatas a duplo recombinante, que passarão pelos procedimentos de confirmação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-JURADO, S. et al. The *Sinorhizobium fredii* HH103 Mucr1 Global Regulator is Connected With the *nod* Regulon and Is Required for Efficient Symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v. 29, p. 700-712, 2016.
- AHMED, M.; RAUF, M.; MUKHTAR, Z.; SAEED, N.A. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 26983-26987, 2017.
- BREWIN, N. J. Development of the legume root nodule. **Annual review of cell biology**, ed. 1, vol. 7, p. 191-226, 1991.
- BROUGHTON, W.; JABBOURI, S.; PEERET, X. Keys to Symbiotic Harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.
- CHERKASOV, N., IBHADON, A. O., FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation**, vol. 90, p. 24-33, 2015.
- CORINNE, M.; DEAKIN, W.; VIPREV, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H.; PERRET, X; ROUGHTON, W. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 9, p. 743-751, abr. 2003.
- DEAKIN, J.; BROUGHTON, J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 312-320, 2009.
- DENARIE, J.; DEBELLE, F.; ROSENBERG, C. Signaling and Host Range Variation in Nodulation. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 497–531, 1992.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology** 2, n. 8, p. 621-631, 2004.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M. The role of biological nitrogen fixation to bio-energy programmes in the tropics. **EMBRAPA**, 2000.
- 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.
- GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. **Current Opinion in Plant Biology**, Wageningen, v. 8, n. 4, p. 346-52, 2005.
- SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L.

(common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p 1-12, abr. 2020.

HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. In Nucleic Acids Symp. v. 41, p. 95-98, 1999.

HUNGRIA, M; VARGAS, M. A T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. Biologia dos solos dos Cerrados. **EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, D. F., p.188-294, 1997.

JIAO, J. *et al.* MucR is Required for Transcriptional Activation of Conserved Ion Transporters to Support Nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* in Soybean Nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29. n. 5, p. 325-361, 2016.

JIAO, J.; TIAN, C. Ancestral zinc-finger protein MucR in alpha-proteobacteria: A novel xenogeneic silencer? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3623-3631, 2020.

JIAO, J. *et al.* The zinc-finger bearing xenogeneic silencer MucR in α-proteobacteria balances adaptation and regulatory integrity. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 16, p. 738-749, 2022.

JONES, K. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p.619-633, 2007.

KELLER, M.; ROXLAU, A.; WENG, W.M.; SCHIMIDT, M.; QUANDT, J.; NIEHAUS, K.; JORDING, D.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* mucR gene regulation the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoclucan. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Mar-Apr;8(2):p. 267-77, 1995.

KOBAYASHI, H.; 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.

KRYSCIAK, D. *et al.* RNA Sequencing Analysis of the Broad-Host-Range Strain *Sinorhizobium fredii* NGR234 Identifies a Large Set of Genes Linked to Quorum Sensing-Dependent Regulation in the Background of a tral and ngrl Deletion Mutant. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p.5655-5671, 2014.

LOH, J., STACEY, G. Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a Unique Integration of Global Regulatory Circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 10-7. 2003.

LUSCOMBE, N. M.; AUSTIN, S. E.; BERMAN, H. M.; THORNTON, J. N. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome biology**, v. 1, p. 1-37, 2000.

OLIVEIRA, G. S. **Obtenção de estirpes mutantes dos genes *y4aM* e *y4fQ* de *Sinorhizobium fredii* NGR234.** Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

NOVOA, R. & LOOMIS, R. S. Nitrogen and plant production. **Plant and soil**, v. 58, n. 1, p. 177-204, 1981.

MARIE, C., et al. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 9, p. 958-966. 2004.

MARIE, C. et al. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 9, p. 743–751. 2003.

PALACIOS, R.; NEWTON, W. E. **Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms.** 3 ed., Dordrecht: Springer, 2005.

PERRET, X. et al. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 32, n2. p. 415-425., 1999.

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V & TERPOLILI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 291–300, 2018.

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

ROCKSTROM, J. et al. Safe and just earth boundaries. **Nature** v. 619, p. 102-111, 2023.

SANTI C., BOGUSZ, D., FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**.111 (5):743-767; 2013.

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

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSCIAK, D.; et al. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4035–4045, 2009.

SINCLAIR, R.; RUFTY, W. Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. **Global Food Security**, v. 1, n. 2, p. 94-98, 2012.

SLAPAKOVA, M. et al. MucR from *Sinorhizobium meliloti*: New Insights into Its DNA Targets and Its Ability to Oligomerize. **International Journal of Molecular Sciences** 24:(14702), p. 1-17, 2023

- STEIN, L. Y., KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology** vol. 26, n.3, p. 94-98, 2016.
- SMITH, B. E. Nitrogenase reveals its inner secrets. **Science**, v.297, p.1654-1655, 2002.
- SOMASEGARAM, P.; HOBEN, J. H. **Handbook for Rhizobia: Methods in legume - Rhizobium technology**. Springer-Verlag, Nova Iorque, 1994.
- TOZATTO, S. A. **Mutagênese e caracterização dos genes y4aM e y4fQ de Sinorhizobium fredii NGR234**. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2023.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**. 49: p. 39-53, 1980.
- VIPREY, V., DEL GRECO, A., GOLINOWSKI, W., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 6, p.1381-1389, 1998.