

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

Determinação do papel das proteínas NodD₁ e NodD₂ na ativação dos genes *nod* em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587

PRISCILA SILVEIRA DOS SANTOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Co-orientação: Dra. Gabriela de Carvalho Fernandes

Porto Alegre, abril de 2018

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Microbiologia Agrícola do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã, que me deram amor, carinho, educação e incentivaram sempre minhas realizações, me apoiando e acreditando no meu potencial (muito mais do que eu). A minha avó leda que, mesmo não estando mais presente fisicamente, o amor e a saudade são infinitos.

A meu melhor amigo e namorado Francisco pelo amor, carinho, paciência e dar o suporte que muitas vezes meus pais não puderam devido à distância.

A minha orientadora, prof. Dra. Luciane Passaglia, pelas oportunidades, por toda aprendizagem e confiança nos trabalhos realizados.

A minha co-orientadora, Dra. Gabriela Fernandes, pelos conselhos, “puxões de orelha”, por me mostrar que sou capaz mesmo quando nem tudo sai como o esperado.

A banca por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Agrícola e demais laboratórios localizados no 2º andar do Departamento de Genética, por me ajudarem sempre que precisei.

Ao Elmo pela disponibilidade e auxílio sempre.

Às amigas formadas que vão além do Departamento de Genética

Aos meus amigos pelo carinho e incansável parceria nas horas boas e ruins, mesmo que muitas vezes eu estivesse ausente e por não terem desistido de mim.

A todas as pessoas que contribuíram na minha vida acadêmica e me ajudaram a crescer como pessoa.

Muito obrigada!

RESUMO

Na simbiose entre soja e bactérias diazotróficas ocorre o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) no nódulo. Nessa associação há uma comunicação constante, pois a liberação de exsudatos pela planta é percebida pela bactéria, que, então, produz lipo-quitto-oligossacarídeos, chamados fatores Nod (FNs), moléculas de sinalização na nodulação. Esses FNs são produtos da atividade dos genes *nod* bacterianos. Os genes *nod* regulatórios codificam fatores de transcrição (FTs) responsáveis pela regulação dos genes *nod* estruturais, que codificam enzimas para a biossíntese dos FNs. Na região promotora dos genes *nod* atua o FT NodD, que se liga em sequências específicas conservadas, chamadas *nod* boxes. Essa comunicação abrange a regulação de vários genes, como os genes *nod* regulatórios *nodD*₁ e *nodD*₂ de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587. *Bradyrhizobium elkanii* são bactérias Gram-negativas, fixadoras de nitrogênio, usadas comercialmente para a produção de inoculantes na agricultura, devido à eficiência do processo de FBN na simbiose, o que justifica o interesse em torno dessa interação. No micro-organismo modelo *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, as proteínas NodD₁ e NodD₂, sintetizadas a partir dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂, respectivamente, têm ações contrárias. Enquanto NodD₁ age como um regulador transcricional positivo dos operons *nod* e regula a sua própria transcrição, NodD₂ atua como um regulador negativo desses operons. Isso despertou o interesse de investigar o papel dessas proteínas em *B. elkanii* SEMIA 587, com a finalidade de testar se elas apresentam funções semelhantes àquelas demonstradas na estirpe padrão USDA110. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi contribuir, através da aplicação de diferentes metodologias, para um melhor entendimento em relação à regulação dos genes *nod* em *B. elkanii* SEMIA 587. Para tanto, fragmentos de DNA contendo os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ dessa bactéria foram clonados nos vetores pGEM e pGEX-4T2, para produção das proteínas recombinantes em *Escherichia coli* BL21, a fim de realizar experimentos de retardamento em gel para comprovar a ligação das proteínas NodD₁ e NodD₂ nos *nod* boxes identificados nas regiões reguladoras dos respectivos genes, bem como determinar a eficiência de cada ligação. A expressão de ambas as proteínas em *E. coli* foi visualizada em gel SDS-PAGE e as proteínas estão em fase de

purificação. Clonagens posteriores realizadas usando o sistema Gateway® para inserção dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂ no vetor de clonagem pENTR foram confirmadas por sequenciamento e recombinadas a dois vetores de levedura (pDEST-22 e pDEST-32). Esses procedimentos visam à execução de ensaios de duplo híbrido para verificar se as proteínas NodD₁ e NodD₂ são capazes de formar heterodímeros funcionais.

ABSTRACT

The process of Biological Nitrogen Fixation (BNF) in the symbiosis between soybean and diazotrophic bacteria occurs in the nodule. There is a constant communication in this association. Plant exudates are perceived by the bacteria that produce lipo-chito-oligosaccharides (LCOs), called Nod Factors (NF), signaling molecules in nodulation. These NFs are product of bacterial *nod* genes activity. Transcription Factors (TFs) are encoded by regulatory *nod* genes, responsible for structural *nod* genes regulation. These structural *nod* genes encode enzymes for NFs biosynthesis. TF NodD acts in the promoter region of *nod* genes and binds to specific conserved sequences, called *nod* boxes. The *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 regulatory *nod* genes *nodD*₁ and *nodD*₂ are involved in this communication. *B. elkanii* are diazotroph gram-negative bacteria used commercially as inoculants source in agriculture, due to the efficiency of the BNF process in the symbiosis, which justifies the interest regarding this interaction. NodD₁ and NodD₂ proteins are synthesized by *nodD*₁ and *nodD*₂ and display contrary actions in the model strain *B. diazoefficiens* USDA 110. While NodD₁ acts as a positive transcriptional regulator of *nod* operons and regulates its own transcription, NodD₂ acts as a negative regulator of these operons. These proteins roles in *B. elkanii* SEMIA 587 aroused the interest of investigating, in order to test whether they have similar functions to those demonstrated in the model strain. Therefore, the goal of this work was to contribute, through the application of different methodologies, to a better understanding regarding *nod* genes regulation in *B. elkanii* SEMIA 587. *B. elkanii* SEMIA 587 *nodD*₁ and *nodD*₂ coding sequences were cloned into pGEM and pGEX-4T-2 vectors. The recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 in the order to carry out gel retardation experiments to verify purified proteins binding to the *nod* boxes identified in *nod* promoters, as well as the efficiency of each binding. The expressed proteins in *E. coli* were visualized by SDS-PAGE and are undergoing purification. Subsequent cloning was realized with the Gateway[®] system for *nodD*₁ and *nodD*₂ insertion into pENTR vector. The constructs were confirmed by sequencing and recombined to yeast vectors (pDEST-22 and pDEST-32). These procedures aim to perform two-hybrid assays to verify if NodD₁ and NodD₂ are capable of forming functional heterodimers.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura típica dos FNs com a representação das enzimas envolvidas na sua biossíntese. Os FNs estão sujeitos a modificações químicas (pela ação dos genes <i>nod</i> , <i>nol</i> e <i>noe</i>)	17
Figura 2: Mapa genético mostrando a organização dos genes <i>nod/nol/noe</i> no genoma de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 (S587)	21
Figura 3: Vetor pGEM-T Easy®	25
Figura 4: Vetor pGEX-4T-2.....	27
Figura 5: Vetor pENTR/D-TOPO.....	30
Figura 6: Vetor pDEST-32.....	30
Figura 7: Vetor pDEST-22.....	31
Figura 8: Extração do DNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587	32
Figura 9: Fragmento de DNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 amplificado utilizando <i>primers</i> específicos para o gene <i>nodD₁</i>	33
Figura 10: Fragmento de DNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 amplificado utilizando <i>primers</i> específicos para o gene <i>nodD₂</i>	33
Figura 11: PCR de colônia do gene <i>nodD₁</i> clonados no vetor de clonagem pGEM-T Easy®	34
Figura 12: PCR de colônia do gene <i>nodD₂</i> clonados no vetor de clonagem pGEM-T Easy®	34
Figura 13: PCR de colônia do gene <i>nodD₁</i> clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2	35
Figura 14: PCR de colônia do gene <i>nodD₂</i> clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2	36
Figura 15: Confirmação por clivagem do gene <i>nodD₁</i> clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e Sall	36
Figura 16: Confirmação por clivagem do gene <i>nodD₂</i> clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e XhoI	36
Figura 17: Visualização das proteínas recombinantes NodD ₁ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.....	37
Figura 18: Visualização das proteínas recombinantes NodD ₂ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.....	38

Figura 19: Visualização das proteínas recombinantes NodD ₁ e NodD ₂ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.	39
Figura 20: Fragmento de DNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 amplificado com enzima de alta fidelidade Q5, utilizando <i>primers</i> específicos para o gene <i>nodD</i> ₁ (945 pb).....	39
Figura 21: Fragmento de DNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 amplificado com enzima de alta fidelidade Q5, utilizando <i>primers</i> específicos para o gene <i>nodD</i> ₂ (986 pb).....	40
Figura 22: PCR de colônia do gene <i>nodD</i> ₁ clonado no vetor de clonagem pENTR/D-TOPO.....	41
Figura 23: PCR de colônia do gene <i>nodD</i> ₂ clonado no vetor de clonagem pENTR/D-TOPO.....	41
Figura 24: Confirmação das construções pDEST-32:: <i>nodD</i> ₁ por análise de restrição utilizando as enzimas HindIII e PstI, visualizadas em gel de agarose 0,8%.....	42
Figura 25: Confirmação das construções pDEST-22:: <i>nodD</i> ₁ por análise de restrição utilizando as enzimas BamHI e PstI em gel de agarose 0,8%.....	42
Figura 26: Confirmação das construções pDEST-32:: <i>nodD</i> ₂ por análise de restrição utilizando a enzima BglI em gel de agarose 0,8%.	43
Figura 27: Confirmação das construções pDEST-22:: <i>nodD</i> ₂ por análise de restrição utilizando a enzima BglI em gel de agarose 0,8%.	43

Sumário

Lista de Figuras.....	8
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 A soja e a Fixação Biológica de Nitrogênio.....	13
2.2 Micro-organismos diazotróficos	15
2.3 Fatores Nod.....	16
2.4 Proteínas NodD	19
3 OBJETIVOS	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Extração de DNA.....	23
4.2 Amplificação dos genes <i>nodD</i>	24
4.3 Obtenção dos vetores contendo os genes <i>nodD</i> ₁ e <i>nodD</i> ₂ para expressão em <i>E. coli</i>	25
4.3.1 Clonagem dos genes <i>nodD</i> ₁ e <i>nodD</i> ₂ no vetor pGEM-T Easy® (Promega).....	25
4.3.2 Clonagem dos genes <i>nodD</i> ₁ e <i>nodD</i> ₂ no vetor de expressão pGEX-4T-2	26
4.4 Indução da Expressão de Proteínas Recombinantes	28
4.5 Clonagem em vetores de levedura	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Indução das Proteínas Recombinantes	32
5.2 Recombinação nos vetores de levedura	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8 ANEXO	52
8.1 Anexo I.....	52

1 INTRODUÇÃO

No final de 2015 foi apresentada no PPGBM a dissertação de mestrado intitulada “Análise genômica comparativa do regulon *nod* em *Bradyrhizobium elkanii*” de autoria de Ivan Zenzen. Nesse trabalho seis genomas de diferentes linhagens de *Bradyrhizobium elkanii* foram anotados, seus genes e proteínas baseados em dados disponíveis nos bancos de dados. A comparação da organização gênica envolvida no processo de nodulação (genes *nod* e *noI*), foi realizada para as diferentes linhagens pela primeira vez para essa espécie. Foi constatado que a espécie usada como referência *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 em vários genomas, não foi mantida na sua totalidade. O principal operon *nod* continuou conservado, mas alguns genes presentes na espécie referência foram perdidos nos genomas de *B. elkanii* (genes *noIZ*, *noIM* e *noIN*, por exemplo), ou substituídos (*nodY* em USDA 110 e *nodK* nas linhagens de *B. elkanii*). No entanto, duas cópias do gene *nodD* (*nodD₁* e *nodD₂*) estavam presentes nos seis genomas analisados, apresentando grande similaridade de sequência.

Entretanto, foi verificado que os motivos de ligação ao DNA hélice-volta-hélice das proteínas NodD₁ e NodD₂, variam na composição de aminoácidos, o que pode interferir na eficiência de reconhecimento do *nod box*. Assim como outras regiões que podem influenciar na dimerização das subunidades para formar o tetrâmero (Zenzen 2015; Passaglia 2017).

Foram investigadas em *B. elkanii* regiões a montante do início da tradução de cada um dos genes codificadores dessas proteínas (250 pares de bases, pb), porque a regulação do processo de nodulação envolve outras (*NoIA* e *NodVW*). Uma busca por regiões conservadas dois *nod boxes* foram identificados na região próxima ao início da região codificadora de NodD₁. Um desses *nod box* se sobrepõem à uma possível região de ligação da RNA-polimerase complexada com o fator σ^{70} . É sabido que esse *nod box* controla a transcrição dos genes presentes no operon *nod*, mas a transcrição tem orientação divergente à de *nodD₁*. Já o outro *nod box* é descrito como um “possível” *nod box* e deve ser o responsável pela ativação da transcrição do gene *nodD₁*. Nos seis genomas de *B. elkanii* analisados e com base no

genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 é sugerido nessas espécies a regulação da transcrição de *nodD*₁ possa ser semelhante.

Em *nodD*₂ o grau de conservação não foi encontrado da mesma forma que encontramos na mesma região de *nodD*₁, pois as linhagens analisadas (SEMIA 587, CCBAU 05737, CCBAU 43297 e USDA 94) apresentaram um *nod box* parcial conservado e uma sequência que pode ser utilizada pela RNA-polimerase complexada com o fator σ^{70} para iniciar a transcrição do gene *nodD*₂. Pode haver diferenças na regulação da transcrição de *nodD*₂ entre as linhagens de *B. elkanii*, pois nas linhagens USDA 3254 e USDA 3259 não foi identificado nenhum *nod box* e nenhuma uma sequência de ligação à RNA-polimerase complexada com o fator σ^{70} (Zenzen 2015).

Embora mencionado na literatura a existência na região promotora de *nodD*₂ de um sítio de ligação para a proteína NolA nada foi confirmado até o momento, inclusive o papel ativador de NolA na transcrição de *nodD*₂. Onde há um *nod box* parcial, as proteínas NodD₁ e NodD₂ talvez possam ligar-se para ativar ou reprimir a transcrição de *nodD*₂, respectivamente. (Passaglia 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A soja e a Fixação Biológica de Nitrogênio

Glycine max (L.) Merr., a soja, é uma leguminosa que pertence à família Fabaceae e seu desenvolvimento ocorre em ambientes quentes, sendo que a temperatura da zona radicular varia entre 25–30°C, favorecendo a atividade simbiótica (Long 1989; Zhang et al. 1996; Gulewicz et al. 2014). O cultivo de soja tem grande impacto no Brasil devido à produção de grãos e seus derivados e na ampliação da área plantada. Para este ano, a produção nacional da soja está estimada em 110,4 milhões de toneladas, com um aumento estimado de 3,2% da área plantada, chegando a 34.991,4 mil hectares. A região Sul, em 2017, foi responsável por 38,29% da soja produzida no Brasil (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento 2017).

Leguminosa com maior impacto econômico no país, a soja é bastante estudada em diferentes aspectos, como, por exemplo, a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e a utilização de inoculantes (Vargas et al. 2001). O inoculante microbiano é o produto final da aliança entre um substrato (sólido, líquido ou gel) e micro-organismos, como exemplo, bactérias. Algumas bactérias são chamadas de bactérias promotoras do crescimento vegetal (do inglês: PGPB- *Plant Growth Promoting Bacteria*) e através de processos, como a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), a produção de sideróforos e a solubilização de fosfatos, elas possuem a capacidade de melhorar o estado nutricional das plantas (Dobbelaere et al. 2003; Vessey 2003). As PGPB podem ser encontradas associadas a outras bactérias, dentro de tecidos de plantas, em vida livre no solo ou na rizosfera (Lynch, 1990). São classificadas de acordo com o tipo de relação com as plantas: associativas ou de vida livre, endofíticas ou simbióticas (Shenoy et al. 2001; Khan 2005).

A utilização de inoculantes proporciona uma melhoria na fertilidade do solo e reduz os impactos na produção de resíduos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente (Kennedy et al. 2004). A adubação química, ao contrário, causa um desequilíbrio na biodiversidade e na conservação do solo (Meena et al. 2015). Na década de 1980, os inoculantes começaram a ser utilizados no Brasil (Vargas et al. 2001), trazendo diversos benefícios para o cultivo de soja.

Atualmente, quatro linhagens bacterianas são recomendadas no Brasil para inoculação com soja: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (Menna et al. 2006). O número de células viáveis e com capacidade de produzir nódulos ativos é o que determina a qualidade dos inoculantes para as leguminosas (Bashan 1998).

A FBN acontece no nódulo, órgão especializado formado nas raízes das plantas a partir da interação entre plantas e micro-organismos do solo e que contém as bactérias fixadoras de nitrogênio (Long 1989; Dakora 1994). É por meio da FBN que o nitrogênio atmosférico (N₂) torna-se disponível aos seres vivos pela sua conversão à amônia (Howard e Rees 1996; Dixon e Kahn 2004).

As bactérias fixadoras de nitrogênio são chamadas de diazotróficas, pois têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico por possuírem o complexo enzimático da nitrogenase. Esse complexo catalisa a reação de conversão do N₂ à amônia, onde são hidrolisados no mínimo 16 ATPs por N₂ fixado (Howard e Rees 1994). A nitrogenase é composta pela Ferro-proteína (Fe-proteína) e pela Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína). A Fe-proteína é um agente redox-ativo que doa elétrons para o componente maior, a MoFe-proteína, a qual possui o sítio catalítico da enzima Nitrogenase (Dixon and Kahn 2004). O gene *nifH* codifica os homodímeros da Fe-proteína (Howard e Rees 1994; Burgess e Lowe 1996a). A MoFe-proteína, por sua vez, é formada pelas subunidades α e β (codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente), um núcleo central contendo um cofactor FeMo (cuja montagem é controlada por diversos outros genes *nif*) e um sítio para ligar a Fe-proteína (Simpson, Frank B. Burris 1984; Thorneley and Lowe 1984; Burgess and Lowe 1996)

As plantas leguminosas, como a soja, e as bactérias diazotróficas se associam de forma simbiótica, e essa cooperação é fundamental para o fornecimento de nitrogênio à planta através da FBN, a qual pode ocorrer no nódulo (Gerahty et al. 1992; Hungria et al. 2007).

O nódulo é um novo órgão da planta, composto por células vegetais infectadas por bacterioides. Os bacterioides são uma forma especializada das bactérias endossimbiontes, capazes de reduzir o nitrogênio (Perret et al. 1991). Essas bactérias modificam o desenvolvimento dos pelos na raiz, tornando-os enrolados para que ali as bactérias possam se fixar e proliferar até atingirem o

cordão de infecção, onde serão liberadas no citoplasma da célula vegetal para que ocorra a diferenciação celular (Robertson et al. 1978). O cordão de infecção, localizado no interior dos pêlos radiculares, é produzido pelas plantas e é através dele que as bactérias se inserem nas raízes, infectando células corticais por endocitose (Loh e Stacey 2003). As células da planta também se diferenciam e ocorre a troca de metabólitos e a FBN (Sutton et al. 1981). Enquanto as bactérias fixadoras de nitrogênio convertem o nitrogênio molecular à amônia, nutrindo as plantas pela FBN, os vegetais fornecem energia às bactérias pela redução do dióxido de carbono em açúcares na fotossíntese (Long 1989; Tóth e Stacey 2015).

2.2 Micro-organismos diazotróficos

Algumas bactérias fixadoras de nitrogênio, como aquelas pertencentes ao gênero *Rhizobium*, estão fortemente associadas à planta e são caracterizadas também como endofíticas, por se localizarem internamente nos tecidos vegetais e não causarem danos moleculares e nem físicos à planta hospedeira (Kuklinsky-Sobral et al. 2004; Dudeja et al. 2012). Os rizóbios associam-se preferencialmente a plantas da Família Fabacea, mas também podem ser encontrados no solo (Sprent 1995; Yang et al. 2006).

Os rizóbios são bactérias aeróbias, gram-negativas, quimiorganotróficas, que têm a forma de bastonetes e não formam esporos, sendo sua mobilidade caracterizada pela presença de um, dois ou até seis flagelos peritríqueos. Seu tamanho pode variar de 0,5-0,9 μm x 1,2-3,0 μm e pertencem ao grupo taxonômico das α -Proteobactérias (Somasegaran e Hoben 1994; Yang et al. 2006). Do grupo rizóbio fazem parte os gêneros: *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Phylorhizobium* e *Sinorhizobium*, que têm em comum o desenvolvimento de nódulos radiculares e são classificados devido à simbiose com plantas hospedeiras específicas (Broughton et al. 2000).

Os primeiros trabalhos envolvendo rizóbios e leguminosas consideraram que *Rhizobia* era uma única espécie capaz de nodular todas as leguminosas. No entanto, Fred et al. (1932) propuseram que o gênero *Rhizobium* fosse classificado sistematicamente em seis espécies: *Rhizobium japonicum*, *R.*

leguminosarum, *R. lupini*, *R. meliloti*, *R. phaseolie* e *R. trifolii*. O motivo dessa organização foi a inoculação em relação à leguminosa hospedeira: *R. japonicum*, por exemplo, realiza simbiose com soja (Delamuta et al. 2013). Com o intuito de diferenciar rizóbios com taxas de crescimento muito mais lentas, o gênero *Bradyrhizobium* foi criado. Essa modificação ocorreu cinquenta anos depois da classificação do gênero *Rhizobium* por Fred et al. (1932) (Delamuta et al. 2013). O gênero *Bradyrhizobium* foi subdividido, inicialmente, em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii* em 1992, e não foram feitas alteração para este gênero (Kuykendall et al. 1992) até que Delamuta et al. (2013) propuseram a reclassificação de algumas variedades de *B. japonicum*, entre elas a SEMIA 5080 que foram, então, nomeadas *B. diazoefficiens* sp. nov (Delamuta et al. 2013). O epíteto “diazoefficiens” refere-se à eficiência na FBN, pois a linhagem SEMIA 5080 é utilizada em inoculantes comerciais no Brasil por ser a mais eficiente (Mendes et al. 2004). *B. diazoefficiens* também são bactérias Gram-negativas e podem ser encontradas no solo ou em simbiose em nódulos de leguminosas (Delamuta et al. 2013; Kulkarni et al. 2015). *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 é a linhagem referência da espécie e teve seu genoma sequenciado, assim como os seus genes e suas respectivas funções foram exploradas (Kaneko et al. 2002).

2.3 Fatores Nod

Ao ocorrer o contato da planta com os micro-organismos diazotróficos há uma comunicação constante, e, até que sejam observadas alterações fenotópicas na raiz, uma relação simbiótica bem estabelecida entre micro-organismo e a planta hospedeira é essencial (Janczarek et al. 2014). As raízes excretam flavonóides, metabólitos secundários da classe dos polifenóis, que induzem a transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*) nos rizóbios, estabelecendo a relação simbiótica e, assim, iniciando a formação dos nódulos (Broughton et al. 2000; Loh e Stacey 2003). A expressão dos genes *nod*, induzida por flavonoides (daidzeína, apigenina, luteolina, por exemplo), leva à síntese de lipoquito-oligossacarídeos (LCOs), que são denominados Fatores Nod (FNs) representados na figura 1 (Glyan'ko e Vasil'eva 2010). Os produtos

dos genes *nod* produzem modificações químicas nos FNs, determinando a especificidade com o hospedeiro (Limpens et al. 2015). Os FNs são percebidos por receptores nas células vegetais contendo o domínio LysM (motivo de lisina). Dessa forma, as plantas distinguem o que pode ser uma ameaça ou não (Geurts et al. 2005; Limpens et al. 2015). A partir dessa interação, dá-se início a infecção, a formação do cordão de infecção e a organogênese do nódulo radicular (Glyan'ko e Vasil'eva 2010).

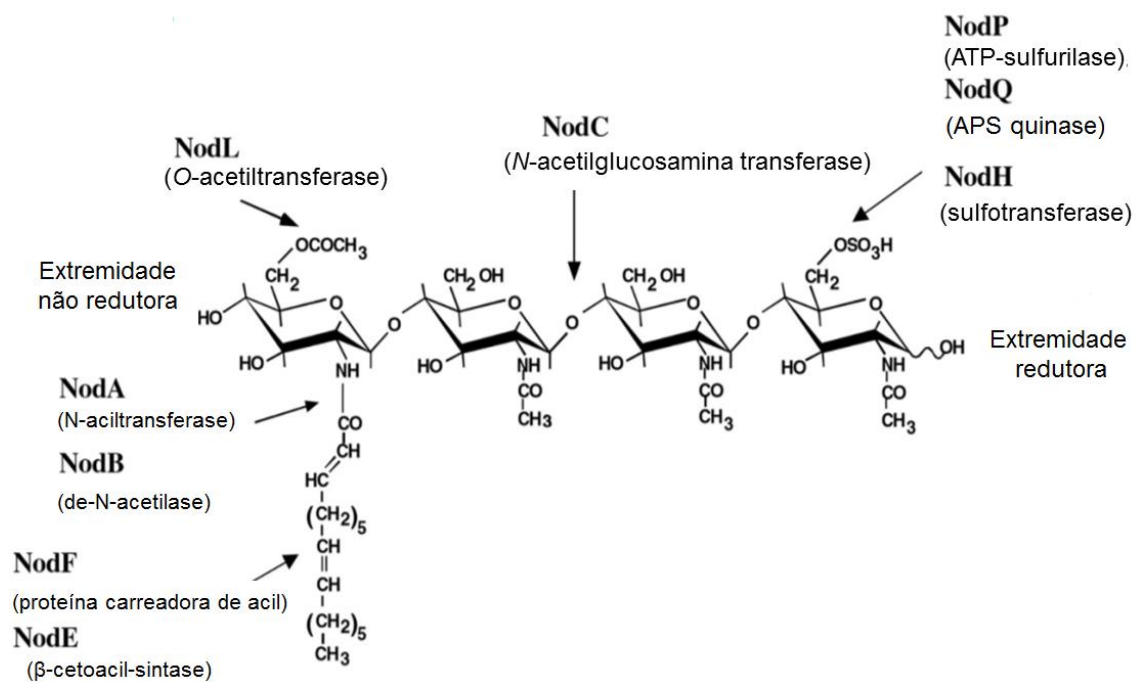


Figura 1: Estrutura típica dos FNs com a representação das enzimas envolvidas na sua biossíntese. Os FNs estão sujeitos a modificações químicas (pela ação dos genes *nod*, *nol* e *noe*). Os diferentes tipos de ramificações (decorações) resultam em uma mistura de FNs produzidos por cada espécie de rizóbio. Os produtos dos genes *nodA*, *nodB* e *nodC* participam da síntese da estrutura central dos FNs (adaptada de Wais et al. 2002).

Os genes *nod* se dividem em genes regulatórios e estruturais. Os genes *nod* regulatórios codificam fatores de transcrição (FTs) que são os responsáveis pela regulação dos genes *nod* estruturais, os quais codificam enzimas para a biossíntese dos FNs. Esses genes estruturais são divididos em

genes *nod* comuns e genes *nod* hospedeiro-específico (van Rhijn e Vanderleyden 1995).

Os genes *nod* estão organizados em operons (operons *nod*), como o operon *nodYABCSUIJnoIMNO* em *B. diazoefficiens* USDA 110, indicando que a regulação da expressão é por mecanismos comuns (Denarie et al. 1993). Os genes *nod* comuns *nodA*, *nodB* e *nodC* são fundamentais na infecção e na nodulação por estarem envolvidos na biossíntese da estrutura central dos NFs (Debellé et al. 1992; van Rhijn e Vanderleyden 1995). Dependendo da espécie, modificações variáveis são adicionadas a essa estrutura principal. Os genes *nod* espécie-específicos estão envolvidos nessas alterações e, portanto, definem a especificidade do hospedeiro, como, por exemplo: *nodEFG*, *nodH*, *nodPQ* e *nodSU* (Debellé et al. 1992). Esses genes já foram encontrados em estirpes de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Kondorosi et al. 1984).

Os genes *nod* hospedeiros-específicos (*hsn*), como os genes *nodV* e *nodW*, são imprescindíveis na nodulação (Downie et al. 1983). Os genes *nodV* e *nodW* pertencem à família de proteínas reguladoras do tipo dois-componentes (*two-component system*), as quais são indispensáveis para nodulação de soja através da percepção de isoflavonas que podem interagir com NodD₁ (Loh et al. 1997). NodV e NodW funcionam como sensores e reguladores, via fosforilação, regulando a expressão de genes *nod* em *B. japonicum* (Göttfert et al. 1990).

Inicialmente o gene *nodD* foi considerado como sendo um gene *nod* comum, mas percebeu-se que, conforme a origem bacteriana mudava, a resposta do produto do gene *nodD* mudava também (Spaink et al. 1987). Foram descritos mais de um gene *nodD* e seu produto, inicialmente foi postulado que a proteína NodD ativava transcricionalmente os demais genes *nod* (Schlaman et al. 1992). Nem todos os micro-organismos tem os mesmos genes *nod* e nem o mesmo número de cópias de genes *nodD*. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* tem apenas um gene *nodD*, enquanto *Rhizobium tropici* pode ter de duas a cinco cópias de *nodD* (del Cerro et al. 2015). Os genes *nodD* podem atuar tanto como ativadores ou repressores nos diferentes micro-organismos onde são encontrados (Schlaman et al. 1992). Geralmente, a proteína NodD₁ atua como ativador da transcrição dos genes *nod* responsiva aos flavonoides liberados pelas raízes das plantas (à exemplo da genisteína e

daidzeína) e NodD₂, com ação contrária, sendo um repressor da transcrição desses genes.

Em *Rhizobium meliloti*, os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ codificam produtos que ativam promotores *nod*, através das proteínas NodD₁ e NodD₂, respectivamente, ao interagirem com diversos indutores de plantas, enquanto em *Rhizobium tropici* CIAT 899, *nodD*₃ e *nodD*₅ são ativadores do gene *nodD*₁ e *nodD*₄ dependendo das condições ambientais para atuar como repressor ou indutor (del Cerro et al. 2015).

2.4 Proteínas NodD

A expressão dos genes *nod* estruturais de *Rhizobium* requer a presença de um sinal vegetal, geralmente os flavonoides, e a presença da proteína reguladora NodD, a qual é um regulador membro da família LysR (Loh e Stacey 2003). Essa família é capaz de regular muitos genes e regulons procarióticos complexos (Schell 1993). Os genes *nod* regulatórios (*nodD*) são bem conservados (Schlaman et al. 1989) e suas proteínas ligam-se aos *nod boxes* (Loh e Stacey 2003). Os *nod boxes* são sequências específicas fortemente conservadas que estão localizadas a montante dos operons *nod* (Rostas et al. 1986) e são caracterizadas pela presença de duas repetição palindrômica (ATCN₉GAT) (van Rhijn e Vanderleyden 1995). Eles são simetricamente ligados por proteínas em formas diméricas ou tetraméricas (Pabo e Sauer 1984). Em *B. elkanii* SEMIA 587, foram identificados a montante de *nodD*₁ dois *nod boxes*, um deles bem conservado e sobreposto à região de ligação da RNA-polimerase, que controla a transcrição dos genes no operon *nod*. A segunda sequência identificada, menos conservada, é um provável *nod box*, que pode ativar a transcrição do gene *nodD*₁. Enquanto a montante de *nodD*₂, foi encontrado um *nod box* parcial bastante conservado (Passaglia 2017). De maneira semelhante, no micro-organismo modelo *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, há duas proteínas NodD, sintetizadas a partir dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂ (respectivamente, NodD₁ e NodD₂) (Loh e Stacey 2003).

Em *B. japonicum*, NodD₁ é um ativador transcricional respondendo a isoflavonas ligantes produzidas por plantas, com auto-regulação e indução por

genisteína e daidzeína (Smit et al. 1992). Quando as proteínas da família LysR não estão presentes na interação com diferentes sinais de flavonoides, a fosforilação é um mecanismo alternativo utilizado na regulação dos genes *nod* (Loh et al. 1997). Em *B. japonicum*, NodVW e Nola também estão envolvidas na modulação da expressão dos genes da nodulação. Primeiramente supunha-se que a regulação do gene *nod* não ocorria via NodD₁ e sim por ativadores transcricionais diferentes, mas com a descrição da via alternativa para a ativação do gene *nod* por NodVW essa dúvida foi esclarecida (Loh et al. 1997).

Em *B. japonicum* o produto do gene *nodD₂* é a proteína NodD₂, a qual é um repressor da expressão dos genes *nod* e é ativada positivamente por Nola. Mesmo estando o gene *nola* localizado em uma região genômica distante de *nodD₂*, Nola e NodD₂ mostraram-se envolvidas no *feedback* e na regulação da atividade dos genes *nod*. Nola é membro da família MerR (Garcia et al. 1996). A família MerR é composta por reguladores transcricionais, os quais ativam a transcrição e possuem uma região de ligação ao DNA hélice-volta-hélice. O gene *nola* codifica três proteínas alternativas, Nola₁, Nola₂ e Nola₃, originadas de códons ATG em fase, mas funcionalmente distintas: Nola₁ controla a expressão de Nola₂ e Nola₃, as quais estão envolvidas na ativação do gene *nodD₂* (Loh et al. 1999).

No micro-organismo modelo *B. diazoefficiens* USDA 110 foi demonstrado que as proteínas NodD₁ e NodD₂ apresentam ações contrárias (Loh e Stacey 2003). Porém, o mecanismo de ação, principalmente de NodD₂, não está esclarecido. *B. elkanii* SEMIA 587 também apresenta as proteínas NodD₁ e NodD₂, despertando o interesse de investigar o papel dessas proteínas nessa bactéria e a sua interação com as sequências regulatórias encontradas no genoma.

Um exemplo de que proteínas NodD diferem no mesmo micro-organismo ocorre em *Rhizobium meliloti*. Nesse organismo são encontradas três cópias do gene *nodD*: enquanto NodD₁ induz a expressão de genes *nod* respondendo ao estímulo de luteolina e uma metoxicalcona, NodD₂ tem interação com uma metoxicalcona e ainda com os não flavonoides estaquidrina e trigonelina, e NodD₃ ativa os genes *nod* sem precisar interagir com moléculas indutoras. No entanto, para a produção da proteína NodD₃, o gene *nodD₃* utiliza

um complexo circuito de regulação, que envolve outro gene regulatório, *syrM* (Honma e Ausubel 1987).

Em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 foram encontradas duas cópias dos genes *nodD*, *nodD₁* e *nodD₂*, como demonstrado na Figura 2. Além disso, nas regiões correspondentes aos promotores desses genes foram encontrados *nod boxes* parciais ou menos conservados, em adição a um *nod box* convencional extremamente conservado (Passaglia 2017). *B. elkanii* SEMIA 587 é uma bactéria fixadora de nitrogênio utilizada comercialmente como fonte para inoculantes na agricultura, devido à eficiência do processo de fixação de nitrogênio na simbiose (Passaglia 2017), o que justifica o nosso interesse do nosso grupo de pesquisa nesta interação.

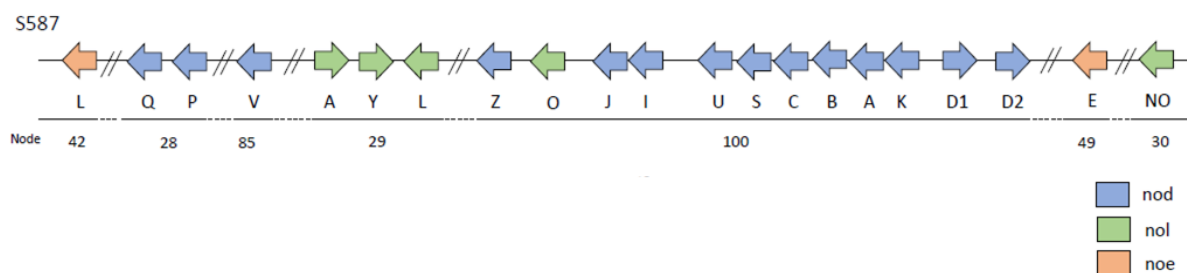


Figura 2: Mapa genético mostrando a organização dos genes *nod/nol/noe* no genoma de *B. elkanii* SEMIA 587 (S587). Letras indicam o nome de cada gene no genoma. As classes de genes estão codificadas por cores e a orientação transcritora é indicada pelas setas. (Adaptada de Passaglia, comunicação pessoal).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir, através da obtenção de ferramentas de biologia molecular, para um melhor entendimento em relação à regulação dos genes *nod* em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587.

3.2 Objetivos específicos

- a) Induzir a expressão das proteínas NodD₁ e NodD₂ de *B. elkanii* SEMIA 587 em *Escherichia coli* para purificar tais proteínas;
- b) Construir vetores para utilização do sistema de duplo-híbrido de levedura contendo os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ de *B. elkanii* SEMIA 587.

4 METODOLOGIA

4.1 Extração de DNA

A extração do DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 foi realizada de acordo com protocolo adaptado pelo nosso grupo de trabalho.

Alíquotas de 1,5 mL da cultura de bactéria multiplicada em meio LM (Vicent 1970) foram submetidas à centrifugação de 12.000 rotações por minuto (rpm) para separação das fases (sobrenadante e *pellet*) por 3 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 700 µL da solução TES (Tris 10 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, NaCl 150 mM em água miliQ). A suspensão foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores.

O sobrenadante foi descartado, o *pellet* bacteriano foi suspenso com 500 µL da solução tampão TE1 (10 mM Tris pH 8; 25 mM EDTA 0,5 M pH 8 e água mili-Q) e homogeneizado. Em seguida 25 µL de lisozima (20 mg/mL) foram adicionados, amostra foi incubada à 37° C por 25 minutos e equilibrada à temperatura ambiente. Foram adicionados 108 µL de Dodecil Sulfato de Sódio 20% (SDS- do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*), 6 µL de proteinase K (200 mg/mL) e a amostra foi submetida à incubação na temperatura de 58°C por 10 minutos e esfriada à temperatura ambiente. 200 µL de Acetato de Amônio (NH₄Ac) 8 M foram adicionados, o tubo foi homogeneizado por inversão cuidadosa e deixado em repouso no gelo por 20 minutos.

Após, foi realizada uma centrifugação e o sobrenadante foi coletado em outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e o volume foi completado para 500 µL com TE1. Um volume de fenol-clorofórmio foi adicionado, a amostra foi homogeneizada por inversão de tubo e centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos para coletar a fase superior do sobrenadante. Essa última etapa foi repetida, mas com um volume de clorofórmio-álcool isoamílico. A fase superior coletada foi transferida para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foi adicionada a solução para suspensão de DNA (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA 0,5 M pH 8 e água mili-Q) até completar o volume de 500 µL.

80 mM de NaCl 5 M e 0,6 volumes de isopropanol gelado foram adicionados à amostra, foi realizada a homogeneização e em seguida uma centrifugação de 12.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado.

500 µL de etanol 70% foram utilizados para lavar o *pellet*. Nessa etapa foi realizada uma centrifugação de 8.000 rpm por 3 minutos, o máximo de líquido foi retirado do tubo de microcentrífuga para que fosse seco à temperatura ambiente. Após o *pellet* estar seco, 30 µL de TE2 foram utilizados para suspender o *pellet*.

A amostra foi quantificada utilizando o NanoDrop Lite Spectrophotometer da Thermo Scientific™ e 2 µL da amostra foram utilizados para verificar a extração de DNA em gel de agarose 1%.

4.2 Amplificação dos genes *nodD*

O DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 foi utilizado como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction-PCR) utilizando o *kit Taq* DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen™, Life Technologies) e *primers* específicos para os genes *nodD* (*nodD*₁ direto: CGGAATTCCCATGCGGTTCAAGGG, *nodD*₁ reverso: GTCGACCTAGCAGCG CCTGCGCGTT, *nodD*₂ direto: CGGAATTCCCATGCGTTTCAACGGC e *nodD*₂ reverso: CTCGAGTCACGATAGTCGCGAGGCA). Os seguintes volumes foram utilizados nas reações: 5 µL de 10x buffer, 1 µL de 10 mM dNTPs, 1,5 µL de 50 mM MgCl₂, 2,5 µL de 10 µM *primer* mix, 1 µL do DNA total extraído, 0,5 µL de Taq e quantidade suficiente para 50 µL de água. As condições foram: denaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 10 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos; e extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese e visualizadas em gel de agarose 1%. Em seguida os fragmentos amplificados contendo as sequências dos genes *nodD* foram purificadas utilizando *kit* de purificação de DNA em banda (Ludwig Biotecnologia).

4.3 Obtenção dos vetores contendo os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ para expressão em *E. coli*

4.3.1 Clonagem dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂ no vetor pGEM-T Easy® (Promega)

As transformações foram feitas em bactérias *E. coli* (DH5α) termocompetentes (Maniatis et al. 1982).

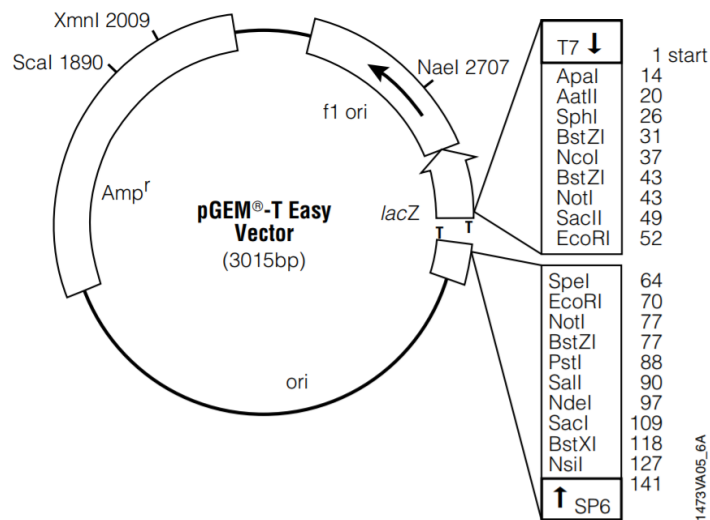


Figura 3: Mapa do vetor pGEM-T Easy® (Promega) mostrando os sítios para a clonagem de fragmentos de DNA.

Foram preparadas duas reações de ligação, uma para cada gene *nodD* (*nodD*₁ e *nodD*₂): 5 µL de tampão; 1 µL da enzima T4; 1 µL do vetor pGEM-T Easy (Figura 3); 3 µL do fragmento de DNA dos genes *nodD*. As reações de ligação foram incubadas à 16°C por 16 horas. Inicialmente, os produtos resultantes das reações de ligação foram transferidos para microtubos contendo 30 µL de bactérias termocompetentes. Os materiais foram incubados por 30 minutos no gelo e, subsequentemente, submetido a um choque térmico à 42°C durante 90 segundos, sem agitação. A solução permaneceu 2 minutos no gelo e 600 µL de LB líquido foram adicionados ao microtubo. Por fim, as bactérias submetidas ao procedimento de transformação foram incubadas à 37°C durante 1 horas. O volume de líquido contendo as células competentes foi dividido em quantidades iguais e plaqueado

em meio de seleção LB sólido contendo 100µg/mL do antibiótico ampicilina, 200 µg/mL X-gal e 0,8 M IPTG e incubadas a 37°C por 16 horas.

Para confirmação das colônias positivas foi realizada uma PCR de colônia, a qual foi realizada mesma forma que a PCR relatada anteriormente, mas ao invés de utilizar 1 µL de DNA, utilizou-se uma pequena parte das colônias, que foram suspensas em 50 µl de água e fervidas a 100°C por 5 minutos. Foram utilizados 5 µl dessa preparação como DNA molde nas PCRs. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese e visualizados em gel de agarose 1%. Foi realizada também a extração de DNA plasmidial utilizando o *kit* de purificação de DNA plasmidial (Ludwig Biotecnologia). Os plasmídeos foram clivados com a enzima de restrição EcoRI (2 µL de tampão React, 2 µL de DNA plasmidial, 1 µL de EcoRI e 15 µL de água mili-Q), por 2 horas na temperatura de 37°C, submetidos a eletroforese e visualizados em gel de agarose 0,8 %. A partir daí foram escolhidos clones para dar continuidade aos próximos passos.

4.3.2 Clonagem dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂ no vetor de expressão pGEX-4T-2

Para expressão das proteínas de interesse, foi selecionado o vetor de pGEX-4T-2 (Figura 4), que permite a expressão de cada proteína em fusão com a proteína glutationa-S-transferase (GST), o que permitirá a purificação das proteínas de interesse por afinidade à GST. Para a clonagem no vetor de expressão pGEX-4T-2, foram realizadas clivagens com enzimas de restrição seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, em duas reações sequenciais por apresentarem incompatibilidade de tampões. As construções obtidas em pGEM foram clivadas com as seguintes combinações de enzimas: pGEM::*nodD*₁ (Sall/EcoRI) e pGEM::*nodD*₂ (EcoRI/XhoI). Após foi realizada a purificação dos fragmentos de interesse clivados utilizando o *kit* de purificação de DNA em banda (Ludwig Biotecnologia), que foram introduzidos no vetor pGEX-4T-2 (também clivado com as mesmas combinações de enzimas) pela reação de ligação catalisada pela T4 DNA ligase (Promega) para *nodD*₁ (2 µL pGEX-4T-2 clivado com EcoRI/Sall, 2 µL de tampão de ligação, 1 µL da enzima T4 DNA ligase e 15 µL do fragmento purificado de *nodD*₁) e *nodD*₂ (1 µL pGEX-

4T-2 clivado com EcoRI/XhoI, 2 µL de tampão de ligação, 1 µL da enzima T4 DNA ligase, 10 µL do fragmento purificado de *nodD*₂ e 6 µL de água), as quais foram mantidas em repouso por 16 horas a 4°C .

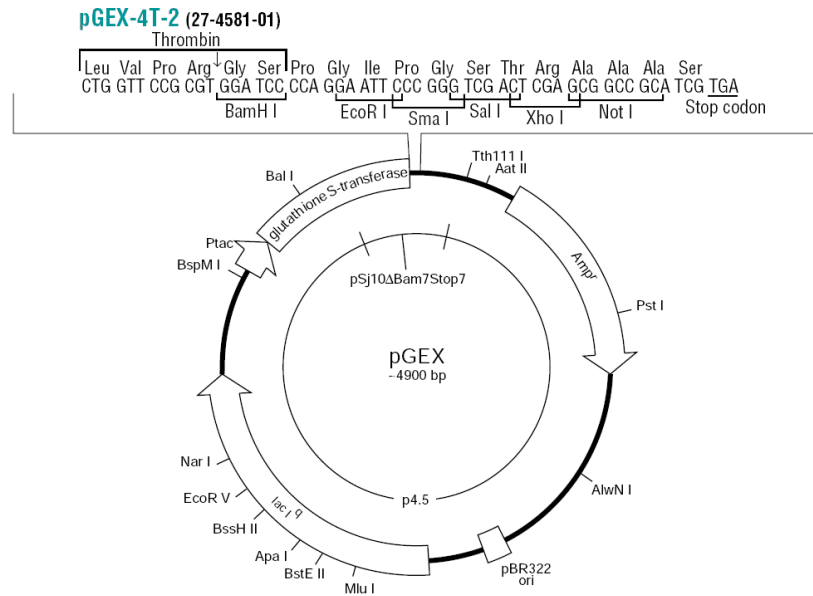


Figura 4: Mapa do vetor pGEX-4T-2 (GE Healthcare Life Sciences).

O volume de 1 µL de cada reação de ligação foi adicionado a 40 µL de *E. coli* eletrocompetentes preparadas utilizando o protocolo de Oswald (2015) adaptado por Bücken-Neto (comunicação pessoal) (Anexo I). O material foi transferido para cubeta de eletroporação e submetido a choque elétrico de 1250 Volts. Em seguida foram adicionados 959 µL de meio líquido LB e as amostras foram incubadas por 1 h em estufa a 37°C. Após foram plaqueadas por espalhamento em placas de Petri contendo meio sólido LB e 100 µg/mL de antibiótico ampicilina. As colônias crescidas nas placas foram inoculadas em 3 mL meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina por 16 horas e realizada a extração do DNA plasmidial (Sambrook e Russell 2001).

As colônias crescidas também foram utilizadas para confirmar a inserção dos genes *nodD* no vetor de expressão pGEX-4T-2 por PCR de colônia, utilizando o *kit Taq* DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen™, Life Technologies) e os mesmo *primers* usados na amplificação desses fragmentos. Os seguintes volumes foram utilizados nas reações também foram os mesmos assim como as condições programadas no termociclador. Essas amostras foram submetidas à eletroforese e visualizadas em gel de agarose 1%. Em

seguida os com o intuito de confirmação também foi realizada análise de restrição com as enzimas EcoRI e Sall para *nodD*₁ e EcoRI e XhoI para *nodD*₂, seguindo o protocolo estabelecido pelo o fabricante das enzimas (Promega) em duas reações subsequentes por incompatibilidade dos tampões utilizados nessas reações.

4.4 Indução da Expressão de Proteínas Recombinantes

Os vetores pGEX recombinantes foram transferidos para *E. coli* (BL-21) eletrocompetentes. As colônias crescidas foram pré-inoculadas em meio líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina para as três construções (pGEX vazio, pGEX::*nodD*₁ e pGEX::*nodD*₂) e incubadas à 37°C por 16 horas. No dia seguinte foram preparados inóculos dessas amostras, as quais ficaram sob agitação até atingirem a densidade ótica de 0,6 (A 600 nm); quando foi adicionado o indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeto) em duas concentrações diferentes: 0,1 mM e 0,4 mM, por 2 horas e 30 minutos a 37°C. Após a indução com IPTG, alíquotas de 1 mL das amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14000 rpm, e os extratos totais de proteínas solúveis foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para visualização das proteínas de interesse.

Outra condição de indução das proteínas NodD₁ e NodD₂ foi aplicada, onde as amostras foram induzidas com IPTG na concentração de 0,4 mM, sob agitação constante de 4 horas à temperatura de 28°C. Após a indução, alíquotas de 1 mL das amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14000 rpm, e os extratos totais dessas proteínas solúveis também foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE para visualização das proteínas de interesse.

4.5 Clonagem em vetores de levedura

O DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 foi utilizado como molde para PCR utilizando a enzima de alta fidelidade Q5 (New England Biolabs), *primers* específicos para os genes *nodD* (*nodD*₁ direto: CACCATGCGGTTCAAGGGAC TTGATCT, *nodD*₁ reverso: CTAGCAGCGCCTGCGCGT, *nodD*₂ direto: CACCAT GCGTTTCAACGGCCTTGATCT e *nodD*₂ reverso: TCACGATAGTCGCGAGGC) e os seguintes volumes de reação: 5 µL de 10x tampão, 1 µL de 10 mM dNTPs, 10 µL de *enhancer*, 2,5 µL de *primer* direto, 2,5 µL de *primer* reverso, 1 µL do DNA total extraído, 0,5 µL de Q5 e quantidade suficiente para 50 µL de água. As condições foram: denaturação inicial a 98°C por 30 segundos; 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, anelamento a 66°C para *nodD*₁ e 60°C para *nodD*₂ por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos; e extensão final à 72°C por 2 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese e visualizadas em gel de agarose 1%. Em seguida as sequências amplificadas dos genes *nodD* foram purificadas utilizando *kit* de purificação de DNA em banda (Ludwig Biotecnologia).

Os fragmento amplificados contendo os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ a partir do DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 foram clonados no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Figura 5), seguindo o protocolo da Invitrogen. Uma razão molar de 1:1 entre o produto da PCR e o plasmídeo pENTR foram misturados em um volume final de 3 µL. A reação foi gentilmente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos e inseridas em *E. coli* DH5α competentes, por eletroporação.

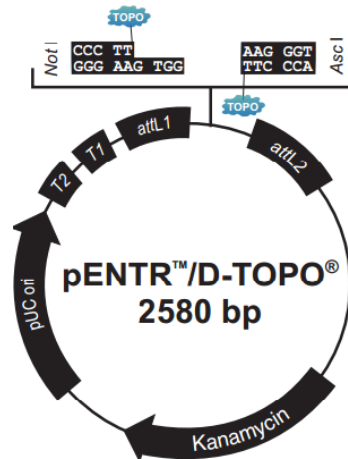


Figura 5: Mapa do vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

Das colônias crescidas foram realizadas PCR de colônia com o intuito de confirmar a inserção em pENTR/D-TOPO, utilizando a enzima de alta fidelidade Q5 (New England Biolabs) e os mesmo *primers* usados na amplificação desses fragmentos. Os seguintes volumes foram utilizados nas reações também foram os mesmos assim como as condições programadas no termociclador. Essas amostras foram submetidas à eletroforese e visualizadas em gel de agarose 1%.

O produto da clonagem dos plasmídeos extraídos do vetor de entrada (pENTR::*nodD*₁ e pENTR::*nodD*₂) foram recombinados a dois vetores de levedura pDEST-32 (Figura 6) e pDEST-22 (Figura 7).

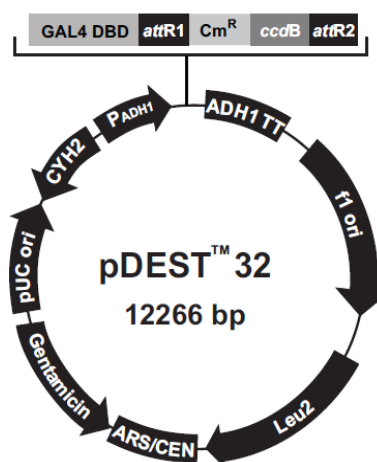


Figura 6: Mapa do vetor pDEST™-32 (Invitrogen).

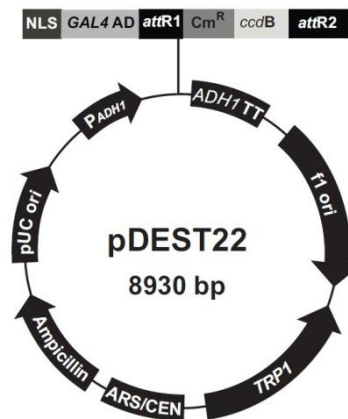


Figura 7: Mapa do vetor pDESTTM-22 (Invitrogen).

A recombinação foi realizada de acordo com o protocolo *Gateway*[®] *LR Clonase*TM (Invitrogen): pENTR::*nodD*₁ (75 ng) foram adicionados ao vetor de destino pDEST-32 (50 ng), Clonase Enzyme Mix (1 µL) e água, totalizando 4 µL. A reação foi incubada por 1 h à 25°C. Em seguida foi adicionada proteinase K (0,5 µL), e a reação foi incubada à 37°C durante 10 minutos. As mesmas concentrações e condições foram utilizadas na recombinação entre: pENTR::*nodD*₁ e pDEST-22; pENTR::*nodD*₂ e pDEST-32; e pENTR::*nodD*₂ e pDEST-22.

Após a etapa de recombinação, 2 µL de cada reação foram utilizados na etapa de transformação de *E. coli* DH5α, igualmente ao protocolo já descrito. As colônias crescidas nas placas foram inoculadas em 3 mL meio LB líquido contendo antibiótico (100 µg/mL de ampicilina para as amostras com pDEST-22 e 50 mg/mL de gentamicina para as amostras com pDEST-32) por 16 horas e após foi realizada a extração do DNA plasmidial (Sambrook e Russell 2001).

Análise de restrição com as enzimas HindIII e PstI para pDEST-32::*nodD*₁, BamHI e PstI para pDEST-22::*nodD*₁, seguindo o protocolo estabelecido pelo o fabricante das enzimas (Promega) em duas reações subsequentes por incompatibilidade dos tampões utilizados nessas reações. Nas confirmações para pDEST-32::*nodD*₂ e pDEST-22::*nodD*₂, o protocolo seguido foi de acordo com a única enzima utilizado BglI (Ludwig Biotecnologia).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução das Proteínas Recombinantes

A extração de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 foi realizada com êxito. O DNA extraído é observado na Figura 8.

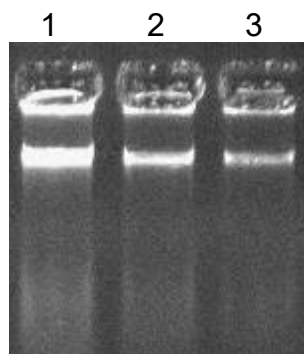


Figura 8: Extração do DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. 1, 2 e 3 = DNA total de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 aplicado nas canaletas com diferentes volumes (5 µL, 3 µL e 2 µL, respectivamente).

Esse mesmo DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 foi utilizado como molde para amplificação dos genes de interesse, *nodD*₁ e *nodD*₂, por PCR. Com o objetivo de induzir a expressão das proteínas NodD₁ e NodD₂ em *E. coli*, a região contendo os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ foi amplificada a partir do DNA genômico. Nas figuras a seguir, observa-se o sucesso da amplificação dos fragmentos *nodD*₁ (Figura 9) e *nodD*₂ (Figura 10). Os tamanhos esperados para cada fragmento são 945 pb para *nodD*₁ e 986 pb para *nodD*₂. Os fragmentos obtidos apresentaram tamanhos de acordo com o esperado, sendo observados próximos à banda de 1000 pb do marcador 1 kb da Ludwig Biotech. Tais fragmentos foram purificados para clonagem no vetor pGEM-T Easy.

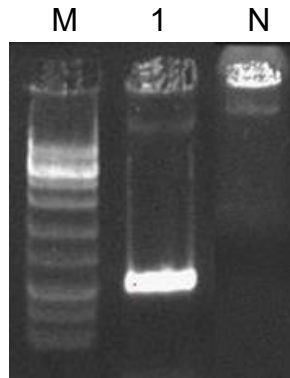


Figura 9: Produtos de PCR para amplificação de *nodD₁* a partir de DNA genômico total de *B. elkanii* SEMIA 587. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); 1= gene *nodD₁* (945 pb) e N= controle negativo.

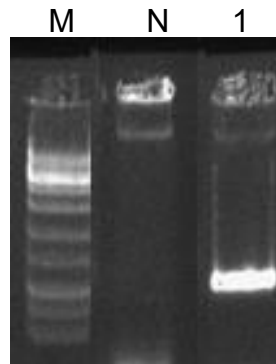


Figura 10: Produtos de PCR para amplificação de *nodD₂* a partir de DNA genômico total de *B. elkanii* SEMIA 587. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo e 1= gene *nodD₂* (986 pb).

Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor de clonagem pGEM-T Easy e as colônias obtidas nessa etapa foram avaliadas por PCR com primers específicos para amplificar de *nodD₁* (Figura 11) e *nodD₂* (Figura 12). É possível observar nessas figuras a amplificação de fragmentos de acordo com o tamanho esperado a partir de vários clones testados. Pequenas variações na migração das bandas observadas na Figura 12 podem ser explicadas por alterações provocadas pelo próprio corante de DNA (GelRed) visto que este foi adicionado a cada amostra antes da corrida. Os clones 2 e 3 da Figura 11 e os clones 2 e 3 da Figura 12 tiveram sua identidade confirmada por

sequenciamento realizado pela empresa *ACTGene Análises Moleculares*. Validando a inserção dos genes na orientação correta e assim podendo ser utilizados na etapa seguinte.

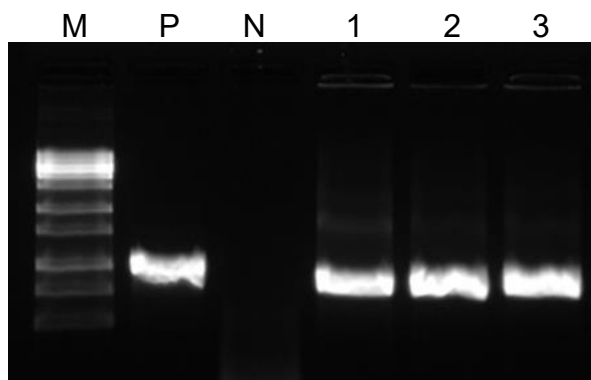


Figura 11: PCR de colônia do fragmento contendo o gene *nodD₁* no vetor de clonagem pGEM-T Easy®. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde); N= controle negativo; 1, 2 e 3 = diferentes clones pGEM::*nodD₁*.

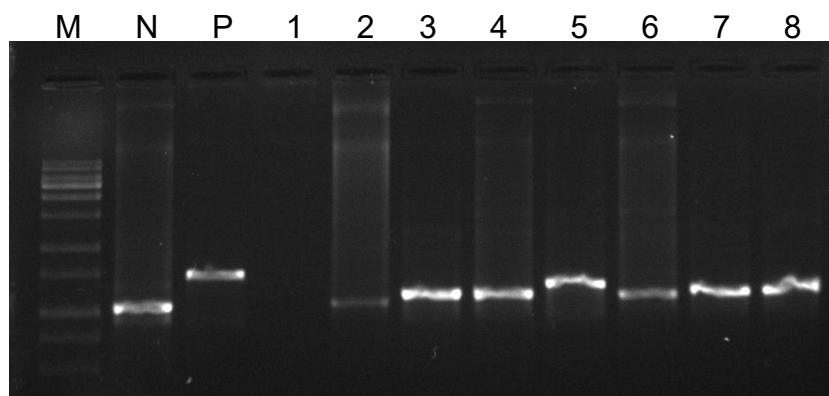


Figura 12: PCR de colônia do fragmento contendo o gene *nodD₂* no vetor de clonagem pGEM-T Easy. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = diferentes clones pGEM::*nodD₂*.

Assim, clonagens subsequentes puderam ser realizadas no vetor de expressão pGEX-4T-2, sendo possível dar continuidade aos próximos passos. A partir das colônias crescidas, foram realizadas PCRs de colônia para

confirmar a inserção dos genes *nodD*₁ e *nodD*₂ no pGEX-4T-2 (Figuras 13 e 14). Na Figura 14 são observadas algumas diferenças na migração dos fragmentos amplificados que podem ter sido provocadas por alterações do próprio corante de DNA (GelRed) visto que este foi adicionado a cada amostra antes da corrida.

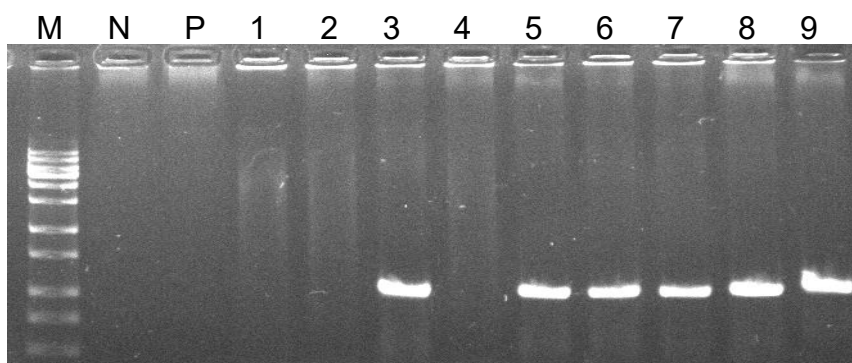


Figura 13: PCR de colônia do fragmento contendo o gene *nodD*₁ clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde) e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 = diferentes clones pGEX::*nodD*₁.

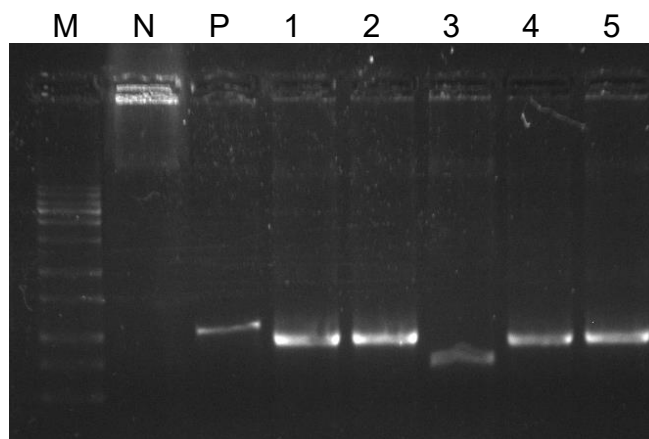


Figura 14: PCR de colônia do fragmento contendo o gene *nodD*₂ clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde); 1, 2, 3, 4 e 5= diferentes clones pGEX::*nodD*₂.

Os clones confirmados por PCR foram inoculados para extração plasmidial, estes plasmídeos obtidos foram submetidos a confirmação por análise de restrição utilizando as enzimas EcoRI e Sall para *nodD*₁ (Figura 15) e EcoRI e XhoI para *nodD*₂ (Figura 16).

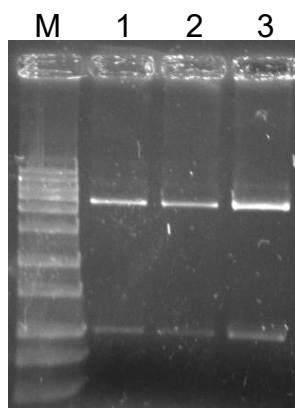


Figura 15: Confirmação por clivagem do fragmento contendo o gene *nodD*₁ clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e Sall. Análise de eletroforese em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); 1, 2 e 3 = diferentes clones pGEX::*nodD*₁.

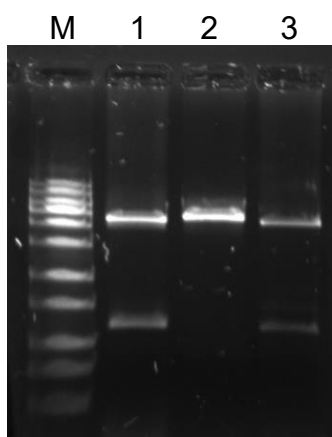


Figura 16: Confirmação por clivagem do fragmento contendo o gene *nodD*₂ clonado no vetor de expressão pGEX-4T-2, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Análise de eletroforese em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); 1, 2 e 3 = diferentes clones pGEX::*nodD*₂.

Com base nesses resultados, foram conduzidos os experimentos de indução de proteínas recombinantes. Foi possível identificar distintamente as

proteínas recombinantes induzidas, em comparação com a amostra controle não-induzida. De acordo com a massa molecular predita pelo programa *ExPaSy- Bioinformatics Resource Portal*, as proteínas fusionadas à GST apresentam massa molecular aproximada de: NodD₁ com 62 kDa e NodD₂ com 63 kDa.

A expressão das proteínas NodD₁ e NodD₂ fusionadas à glutathione S-transferase (GST) foi induzida com IPTG na concentração de 0,1 mM e 0,4 mM sob agitação constante à temperatura de 37°C por 2 horas e 30 minutos. Os extratos totais de proteínas solúveis foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para visualização das proteínas de interesse (Figuras 17 e 18). A GST sozinha, com massa de 26 kDa, é visível nesses dois géis, induzida a partir de clones portanto o vetor pGEX-4T-2 vazio.

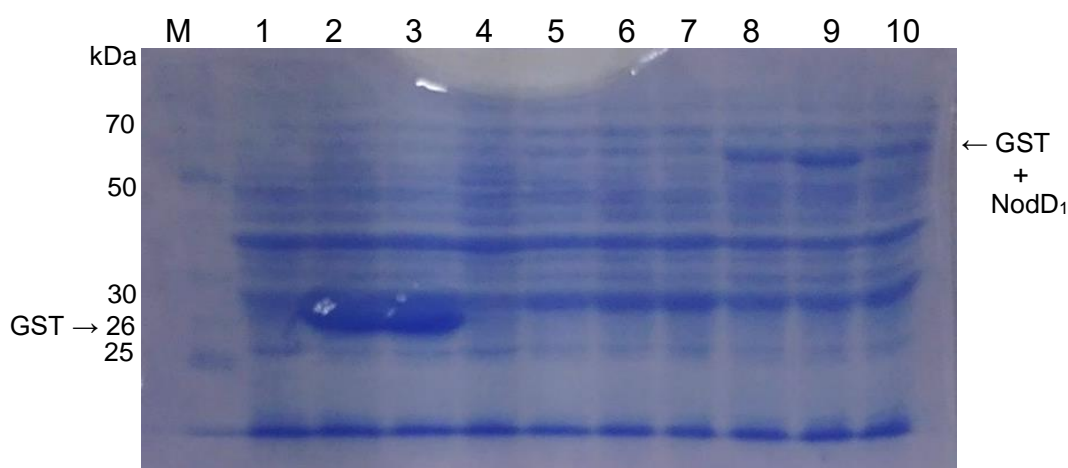


Figura 17: Visualização das proteínas recombinantes NodD₁ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes. M= marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen); 1= pGEX-4T-2 vazio não-induzido; 2= pGEX-4T-2 vazio induzido com 0,1 M de IPTG e 3 = pGEX-4T-2 vazio induzido com 0,4 M de IPTG; 4= clone 1 de NodD₁ não-induzido; 5= clone 1 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG; 6= clone 1 de NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG; 7= clone 2 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG; 8= clone 2 de NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG; 9= clone 3 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG e 10= clone 3 de NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG.

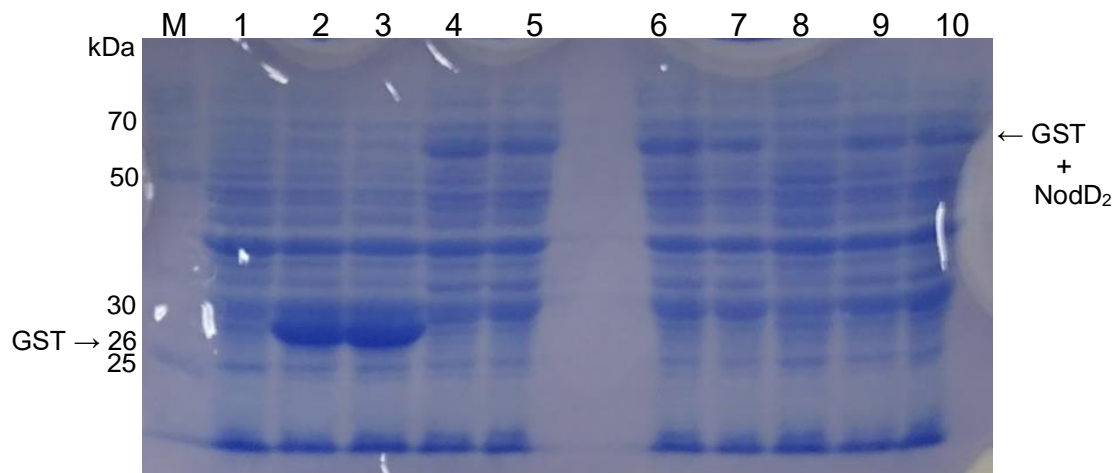


Figura 18: Visualização das proteínas recombinantes NodD₂ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. M= marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen); 1= pGEX-4T-2 vazio não-induzido; 2= pGEX-4T-2 vazio induzido com 0,1 M de IPTG e 3 = pGEX-4T-2 vazio induzido com 0,4 M de IPTG; 4= clone 1 de NodD₁ não-induzido; 5= clone 1 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG; 6= clone 1 de NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG; 7= clone 2 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG; 8= clone 2 de NodD₁ não-induzido com 0,4 M de IPTG; 9= clone 3 de NodD₁ induzido com 0,1 M de IPTG e 10= clone 3 de NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG.

A nova indução com condições diferentes (0,4 mM de IPTG, agitação de 4 horas a 28°C), resultou em bandas com o tamanho obtido de acordo com o esperado (NodD₁ com 62 kDa e NodD₂ com 63 kDa). Assim como nos géis apresentados nas Figuras 17 e 18 é possível visualizar também só a banda da GST. Após essa nova indução, os extratos totais de proteínas solúveis foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Podemos observar claramente a indução da expressão de proteínas com o tamanho esperado a partir dos dois clones testados tanto na expressão de NodD₁ como na expressão de NodD₂ (Figura 19).

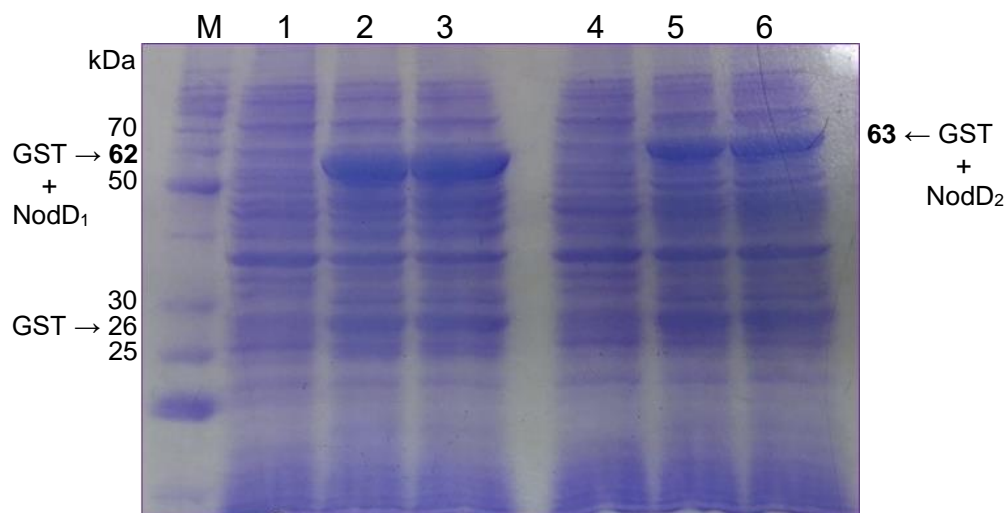


Figura 19: Visualização das proteínas recombinantes NodD₁ e NodD₂ pela análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. M= marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen); 1= NodD₁ não-induzido; 2 e 3= NodD₁ induzido com 0,4 M de IPTG; 4= NodD₂ não-induzido; 5 e 6= NodD₂ induzido com 0,4 M de IPTG.

Confirmada a indução das proteínas NodD₁ e NodD₂, elas serão purificadas para serem submetidas ao Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética.

5.2 Recombinação nos vetores de levedura

Com o objetivo de recombinar os genes *nodD*₁ e *nodD*₂ de *B. elkanii* SEMIA 587 em vetores de levedura (Figura 6 e 7) amplificou-se a região CDS do DNA total extraído de *B. elkanii* SEMIA 587 (Figura 8) com a enzima de alta fidelidade Q5 e primers específicos para os genes *nodD*₁ (Figura 20) e *nodD*₂ (Figura 21).

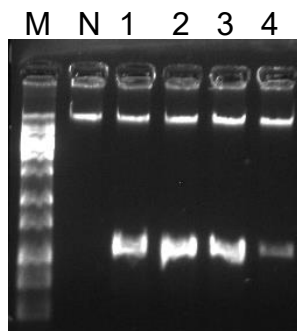


Figura 20: Fragmento de DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde amplificado com enzima de alta fidelidade Q5, utilizando *primers* específicos para o gene *nodD*₁ (945 pb) com diferentes temperaturas de anelamento. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; 1= anelamento a 64°C; 2= anelamento a 66°C; 3= anelamento a 68°C; e 4 = anelamento a 70°C e 5= anelamento a 72°C.

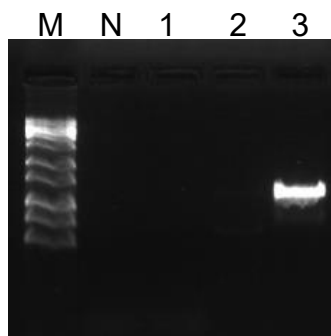


Figura 21: Fragmento de DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde amplificado com enzima de alta fidelidade Q5, utilizando *primers* específicos para o gene *nodD*₂ (986 pb). Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; 1= DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 amplificado com a temperatura de anelamento de 50°C; 2= DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 amplificado com a temperatura de anelamento de 55°C; 3= DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 amplificado com a temperatura de anelamento de 60°C.

Logo, os genes *nodD* foram clonados ao vetor de entrada pENTR (Figura 5). As construções pENTR::*nodD*₁ e pENTR::*nodD*₂ foram confirmadas por PCR de colônia (Figura 22 e 23) e sequenciamento realizado pela empresa *ACTGene Análises Moleculares*. O sequenciamento é necessário por mais que nesse caso a clonagem seja direcionada, pois em um experimento de clonagem anterior foi verificado que, em alguns clones, com as inserções confirmadas por PCR e clivagem foi observado no sequenciamento que o gene *nodD*₁ havia sido clonado de forma invertida no pENTR. Além disso, o sequenciamento confirmou a identidade das sequências clonadas e a ausência de mutações.

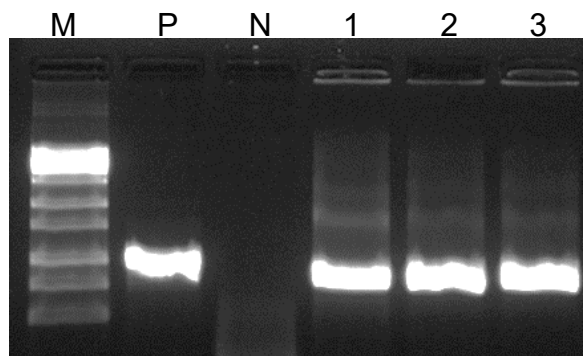


Figura 22: PCR de colônia do gene *nodD₁* clonado no vetor de clonagem pENTR/D-TOPO. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde); N= controle negativo; 1, 2 e 3= diferentes clones pENTR::*nodD₁*.

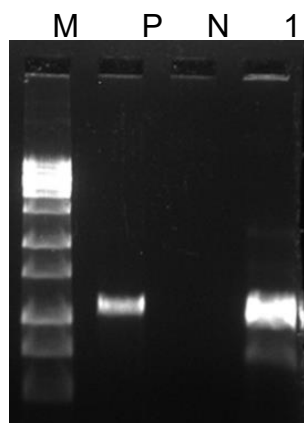


Figura 23: PCR de colônia do gene *nodD₂* clonado no vetor de clonagem pENTR/D-TOPO. Análise de eletroforese em gel de agarose 1%. M= marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia); N= controle negativo; P= controle positivo (DNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizado como molde); 1= clone pENTR::*nodD₂*.

Os plasmídeos corretos foram isolados e confirmada a inserção em pENTR, os genes *nodD₁* e *nodD₂* puderam ser recombinados aos vetores de destino pDEST-32 (Figura 6) e pDEST-22 (Figura 7). Para confirmar a inserção nos vetores levedura as construções foram submetidas a análise de restrição (Figuras 24, 25, 26 e 27) e validadas por sequenciamento, o qual foi realizado pela empresa *Magrogen Inc.*

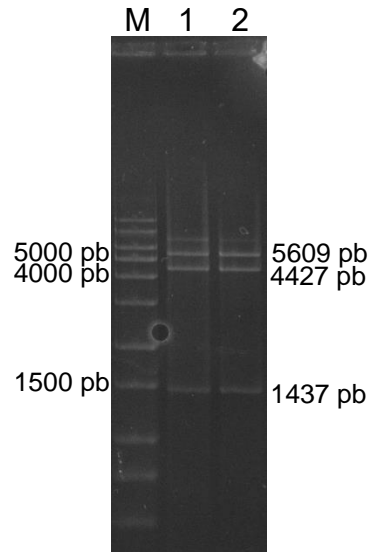


Figura 24: Confirmação das construções pDEST-32::*nodD*₁ por análise de restrição utilizando as enzimas HindIII e PstI, visualizadas em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia). 1 e 2: pDEST-32::*nodD*₁ extração plasmidial de diferentes clones.

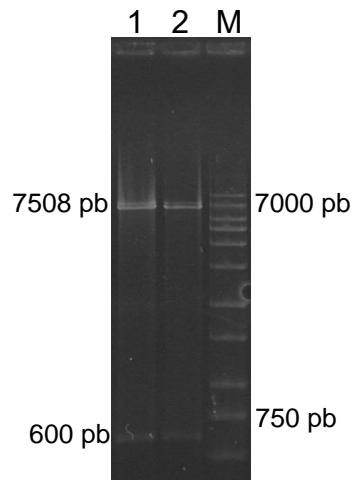


Figura 25: Confirmação das construções pDEST-22::*nodD*₁ por análise de restrição utilizando as enzimas BamHI e PstI em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia). 1 e 2: pDEST-22::*nodD*₁ extração plasmidial de diferentes clones.

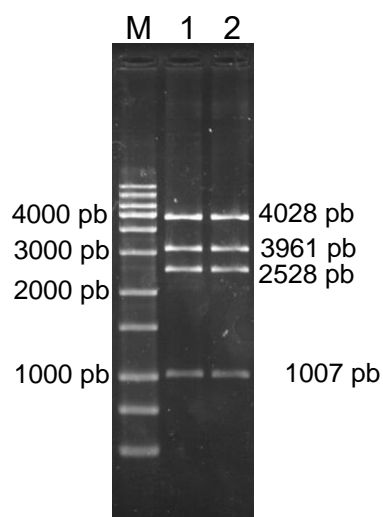


Figura 26: Confirmação das construções pDEST-32::*nodD*₂ por análise de restrição utilizando a enzima BgII visualizadas em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia). 1 e 2: pDEST-32::*nodD*₂ extração plasmidial de diferentes clones.

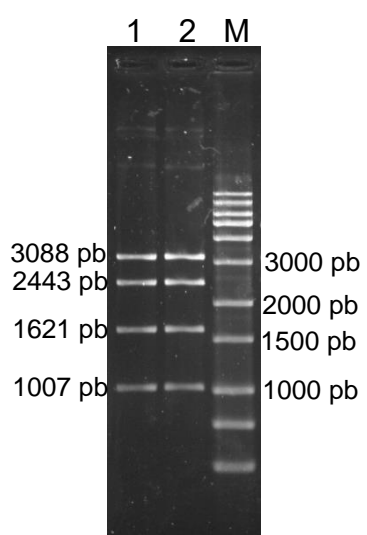


Figura 27: Confirmação das construções pDEST-22::*nodD*₂ por análise de restrição utilizando a enzima BgII visualizadas em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1kb (Ludwig Biotecnologia). 1 e 2: pDEST-22::*nodD*₂ extração plasmidial de diferentes clones.

Uma clonagem foi realizada utilizando o sistema Gateway® para inserção dos genes *nod* no vetor de clonagem pENTR. A clonagem do DNA de interesse no vetor pENTR permitiu que o produto de PCR entrasse na orientação correta no vetor. A análise de sequenciamento confirmou, em

ambos os sentidos, as construções pENTR::*nodD*₁ e pENTR::*nodD*₂. Depois de confirmadas por sequenciamento, essas construções foram recombinadas nos vetores de levedura pDEST-32 e pDEST-22. Com todas essas construções agora confirmadas, os plasmídeos obtidos serão transformados em levedura para realização do ensaio de duplo-híbrido, a fim de verificar se NodD1 e NodD2 são capazes de interagir.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalidade de comprovar a ligação das proteínas NodD₁ e NodD₂ aos *nod boxes* previamente identificados nas regiões regulatórias dos genes *nodD₁* e *nodD₂* no trabalho anterior de Zenzen (2015), os fragmentos de DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 contendo as respectivas sequências gênicas foram clonados em plasmídeos apropriados e para expressão em *E. coli*. A indução das proteínas NodD em *E. coli* foi bem sucedida, como foi demonstrado nos resultados. Nesse momento, as proteínas recombinantes estão sendo purificadas e serão utilizadas no Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (do inglês *Electrophoretic Mobility Shift Assay* – EMSA), onde, além das proteínas purificadas, serão utilizados fragmentos de aproximadamente 55 pb contendo as regiões identificadas como possíveis *nod boxes* nas regiões regulatórias de ambos os genes *nodD₁* e *nodD₂* de *B. elkanii* SEMIA 587. Um fragmento de tamanho similar, contendo alterações pontuais em nucleotídeos conservados do *nod box* será também incluído nesses experimentos como controle negativo.

Paralelamente ao experimento acima descrito, foram realizadas construções nos vetores utilizados no sistema de duplo híbrido de levedura, a fim de verificar a existência de interações funcionais entre as proteínas NodD₁ e NodD₂. As construções pDEST-32::*nodD₁*, pDEST-22::*nodD₁*, pDEST-32::*nodD₂* e pDEST-22::*nodD₂*, já obtidas, serão confrontadas para verificar em qual construção as proteínas NodD₁ e NodD₂ são capazes ou não de formar heterodímeros.

Assim, através dos experimentos apresentados nesse trabalho esperamos responder algumas questões importantes para o avanço do conhecimento da regulação dos genes *nod* na bactéria *B. elkanii* SEMIA 587.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729–770.

Broughton WJ, Jabbouri S and Perret X (2000) Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 182:5641–5652. doi: 10.1128/JB.182.20.5641-5652.2000

Burgess BK and Lowe DJ (1996) Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem Rev* 96:2983–3012. doi: 10.1021/cr950055x

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento (2017) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. *Monit Agric Safra* 2017. doi: ISSN 2318-6852

Dakora FD (1994) Nodulation Gene Induction and Genetic-Control in the Legume - Rhizobium Symbiosis. *S Afr J Sci* 90:596–599.

Debellé F, Rosenberg C and Dénarié J (1992) The Rhizobium, Bradyrhizobium, and Azorhizobium NodC Proteins Are Homologous to Yeast Chitin Synthases. *Mol Plant-Microbe Interact* 5:443–446.

del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks BB, Espuny M del R, Rodríguez-Carvajal MÁ, Soria-Díaz ME, Nakatani AS, Hungria M, Ollero FJ et al. (2015) Opening the “black box” of nodD3, nodD4 and nodD5 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* 16:1–10. doi: 10.1186/s12864-015-2033-z

Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Melo IS, Martínez-Romero E and Hungria M (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of Bradyrhizobium japonicum group Ia strains as Bradyrhizobium diazoefficiens sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3342–3351. doi: 10.1099/ijs.0.049130-0

Denarie J, Debelle F, Truchet G and Prome J-C (1993) New Horizons in Nitrogen Fixation. p 790

Dixon R and Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2:621–631. doi: 10.1038/nrmicro954

Downie JA, Hombrecher G, Ma Q, Knight CD, Wells B and Johnston AWB (1983) Cloned Nodulation Genes of Rhizobium leguminosarum Determine Host-Range Specificity. *Mol Gen Genet* 1990:359–365.

Dudeja SS, Giri R, Saini R, Suneja-madan P and Kothe E (2012) Interaction of endophytic microbes with legumes. *J Basic Microbiol* 52:248–260. doi: 10.1002/jobm.201100063

Fred EB, Baldwin IL and McCoy E (1932) Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin Press. Madison 5:

Garcia M, Dunlap J, Loh J and Stacey G (1996) Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:625–636.

Gerahty N, Caetano-Anollés G, Joshi PA and Gresshoff PM (1992) Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. *Plant Sci* 85:1–7. doi: 10.1016/0168-9452(92)90087-3

Glyan'ko AK and Vasil'eva GG (2010) Reactive oxygen and nitrogen species in legume-rhizobial symbiosis: A review. *Appl Biochem Microbiol* 46:15–22. doi: 10.1134/S0003683810010023

Göttfert M, Grob P and Hennecke H (1990) Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci* 87:2680–2684. doi: 10.1073/pnas.87.7.2680

Gulewicz P, Martinez-Villaluenga C, Kasprowicz-Potocka M and Frias J (2014) Non-nutritive compounds in Fabaceae family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing - A review. *Polish J Food Nutr Sci* 64:75–89. doi: 10.2478/v10222-012-0098-9

Howard JB and Rees DC (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem Rev* 96:2965–2982. doi: 10.1021/cr9500545

Howard JB and Rees DC (1994) NITROGENASE: A Nucleotide-Dependent Molecular.

Hungria M, Campo RJ and Mendes IC (2007) A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Embrapa 80.

Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grzadziel J and Palusińska-Szys M (2014) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol* 85:94–113. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.08.010

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K et al. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9:189–97. doi: 10.1093/dnares/9.6.189

Kennedy IR, Choudhury ATMA and Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion

be better exploited? Soil Biol Biochem 36:1229–1244. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.006

Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J Trace Elem Med Biol 18:355–364. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.006

Kondorosi E, Banfalvi Z and Kondorosi A (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. MGG Mol Gen Genet 193:445–452. doi: 10.1007/BF00382082

Kuklinsky-sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-kleiner AA and Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. 6:1244–1251. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x

Kulkarni G, Busset N, Molinaro A, Gargani D, Chaintreuil C, Silipo A, Giraud E and Newman DK (2015) Specific hopanoid classes differentially affect free-living and symbiotic states of bradyrhizobium diazoefficiens. MBio 6:1–9. doi: 10.1128/mBio.01251-15

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE and Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can J Microbiol 38:501–505.

Limpens E, van Zeijl A and Geurts R (2015) Lipochitooligosaccharides Modulate Plant Host Immunity to Enable Endosymbioses. Annu Rev Phytopathol 53:311–334. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120149

Loh J, Garcia M and Stacey G (1997) NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 179:3013–3020. doi: 10.1128/jb.179.9.3013-3020.1997

Loh J and Stacey G (2003) Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a Unique Integration of Global Regulatory Circuits. Appl Environ Microbiol 69:10–17. doi: 10.1128/AEM.69.1.10

Loh J, Stacey MG, Sadowsky MJ and Stacey G (1999) The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene Encodes Three Functionally Distinct Proteins. J Bacteriol 181:1544–1554.

Long SR (1989) Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. Cell 56:203–214. doi: 10.1016/0092-8674(89)90893-3

Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Meena RS, Dhakal Y, Bohra JS, Singh SP, Singh MK, Sanodiya P and Meena H (2015) Influence of Bioinorganic Combinations on Yield, Quality and Economics of Mung Bean. *Am J Exp Agric Egypt* 8:159–166. doi: 10.9734/AJEA/2015/17065
- Mendes IC, Hungria M and Vargas MAT (2004) Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biol Fertil Soils* 40:28–35. doi: 10.1007/s00374-004-0739-1
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel E V., Hess PN and Martínez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315–332. doi: 10.1016/j.syapm.2005.12.002
- Oswald N (2015) DIY Electrocompetent *E.coli*. <https://bitesizebio.com/969/diy-electrocompetent-e-coli/>.
- Pabo C and Sauer RT (1984) Protein-Dna Recognition. *Ann Rev Biochem* 53:293–321.
- Passaglia LMP (2017) *Bradyrhizobium elkanii* nod regulon: Insights through genomic analysis. *Genet Mol Biol* 40:703–716. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2016-0228
- Perret X, Broughton WJ and Brenner S (1991) Canonical ordered cosmid library of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* species NGR234. *Genetics* 88:1923–1927.
- Robertson JG, Lyttleton P, Bullivant S and Grayston GF (1978) Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J Cell Sci* 30:129–149.
- Rostas K, Kondorosi E, Horvath B, Simoncsits a and Kondorosi a (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1757–1761. doi: 10.1073/pnas.83.6.1757
- Sambrook J and Russell DW (2001) Appendix 8 “Commonly Used Techniques in Molecular Cloning.” *Molecular Cloning*, 3rd ed. p A8.9-A8.10
- Schell MA (1993) Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annu Rev Microbiol* 47:597–626.
- Schlaman HR, Spaink HP, Okker RJ and Lugtenberg BJ (1989) Subcellular localization of the nodD gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 171:4686–4693. doi: 10.1128/jb.171.9.4686-4693.1989
- Schlaman HRM, Okker RJH and Lugtenberg BJJ (1992) Regulation of nodulation gene expression by nodD in rhizobia. *J Bacteriol* 174:5177–5182. doi: 10.1128/jb.174.16.5177-5182.1992

Shenoy V V, Kalagudi GM and Gurudatta B V (2001) Towards Nitrogen Autotrophic Rice. *Curr Sci Assoc* 81:451–457.

Simpson, Frank B. Burris RH (1984) A Nitrogen Pressure of 50 Atmospheres Does Not Prevent Evolution of Hydrogen by Nitrogenase. *Science* (80-) 224:1095–1097.

Smit G, Puvanesarajah V, Carlson RW, Barbour WM and Stacey G (1992) *Bradyrhizobium japonicum nodD1* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *J Biol Chem* 267:310–318.

Somasegaran P and Hoben HJ (1994) Handbook for Rhizobia. doi: 10.1007/978-1-4613-8375-8

Spaink HP, Wijffelman CA, Pees E, Okker RJH and Lugtenberg BJJ (1987) Rhizobium nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328:337–339.

Sprent JI (1995) Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol Biochem* 27:401–407. doi: 10.1016/0038-0717(95)98610-Z

Sutton WD, Pankhurst CE and Craig AS (1981) The Rhizobium Bacterioid State. In: Giles KL and Atherly AG (eds) *Biology of the Rhizobiaceae: International Review of Cytology*. Palmerston North, pp 143–171

Thorneley RNF and Lowe DJ (1984) The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase action. *Biochem J* 224:887–94. doi: 10.1042/bj2240887

Tóth K and Stacey G (2015) Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis? *Front Plant Sci* 6:1–7. doi: 10.3389/fpls.2015.00401

van Rhijn P and Vanderleyden J (1995) The Rhizobium -Plant Symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124–142.

Vargas MAT, Mendes I de C, Suhel AR and Peres JRR (2001) Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja. 4–7.

Wais RJ, Keating DH and Long SR (2002) Structure-Function Analysis of Nod Factor-Induced Root Hair Calcium Spiking in Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Physiol* 129:211–224. doi: 10.1104/pp.010690

Yang J, Sangwan I and O'Brian MR (2006) The *Bradyrhizobium japonicum* Fur protein is an iron-responsive regulator in vivo. *Mol Genet Genomics* 276:555–564. doi: 10.1007/s00438-006-0162-4

Zenzen IL (2015) Genômica comparativa do operon e regulon *nod* em *Bradyrhizobium elkanii*.

Zhang F, Dashti N, Hynes RKK and Smith DL (1996) Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Ann Bot* 77:453–460. doi: 10.1006/anbo.1996.0055

8 ANEXO

8.1 Anexo I

1. Inocular uma única colônia crescida, sem antibiótico, da bactéria desejada e inocular em 10 mL de 2xYT; à 37°C por no máximo 16 horas, sob agitação contante.
2. Adicionar 3 mL desse pré-inóculo em 300 mL de 2xYT (sem antibióticos). Crescer até DO₆₀₀ (Densidade Ótica) entre 0,6 - 0,9.
3. Ao alcançar a DO desejada a cultura deve ser mantida no gelo por 15 minutos e depois transferidas para tubos de centrifuga de 50 mL (previamente resfriados). O volume da cultura deve ser dividido igualmente nos tubos.
4. Centrifugar as células a 4.000 rpm por 25 minutos a 4°C.
5. Descartar os sobrenadantes e ressuspender cada pellet em 80 mL de água estéril gelada (mantê-las no gelo por todo o tempo).
6. Centrifugar as células a 4.000 rpm por 25 minutos a 4°C.
7. Descartar os sobrenadantes e ressuspender cada pellet em 40 mL de água estéril gelada.
8. Centrifugar as células a 4.000 rpm por 25 minutos a 4°C.
9. Descartar os sobrenadantes e ressuspender cada pellet em 8 mL de glicerol 10% estéril gelado e juntar as amostras em um único tubo.
10. Centrifugar as células a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
11. Descartar o sobrenadante e ressuspender em 1,2 mL de glicerol 10% estéril resfriado.

12. Aliquotar 40 μ l das células em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (proviamente resfriado), congelar rápido em gelo e estocar a - 80°C.