

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS DE GENES DA
ILHA SIMBIÓTICA ENTRE *Bradyrhizobium elkanii* E
*Bradyrhizobium japonicum***

Luciano Takeshi Kishi

Orietadora: Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2007

K61a Kishi, Luciano Takeshi
Análise comparativa das sequências de genes da ilha simbiótica
entre *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* /
Luciano Takeshi Kishi. -- Jaboticabal, 2007
viii, 75 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Maria José Valarini, Haroldo Alves Pereira
Junior, Lucia Maria Carareto Alves, Maria Inês Tiraboschi Ferro
Bibliografia

1. Rizóbio. 2. Genoma 3. Fixação de nitrogênio. 4. Ilha simbiótica
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Email: luciano.kishi@gmail.com

Dados Curriculares do Autor

LUCIANO TAKESHI KISHI – nascido aos 9 dias do mês de março de 1976, em São José do Rio Preto, SP, é licenciado e bacharel em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas Riopretense - FIRP, São José do Rio Preto, SP, em janeiro de 1998, Especialista em Bioinformática pelo Laboratório Nacional de Computacional Científica – LNCC, Petrópolis, RJ, em 2002 e mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista, Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAVJ, Jaboticabal em abril de 2002.

NOVO TEMPO

Um novo mundo,
Um novo sonho vamos encontrar.
Uma nova era,
Numa nova esperança a realizar.
Um novo tempo em um novo momento,
Vamos nos transformar.

Novas lembranças com saudade
Vamos deixar e levar.
Novos luazes vão nos guiar
Em novas montanhas a passar.
Novos desejos com novos anseios
Vamos lutar.

Venceremos essa passagem
E com a felicidade
Iremos encontrar.
Novas lágrimas cairão
No novo tempo com o novo sonho,
Em um novo momento...

Patrícia Yoshie Kishi

Aos meus pais Toiti Kishi e
Aquica Cano Kishi,
meus irmão Celso e Patrícia,
minha avó Taki.

Dedico

Agradecimentos

Aos meus pais Toiti e Aquica pela compreensão, confiança e dedicação aos meus estudos.

Aos meus irmãos Marcelo (*in memoriam*), Celso e Patrícia.

Aos meus avós que sempre me incentivaram.

À toda minha família que me apioaram.

À Rosangela meus profundos agradecimentos pela paciência e convivência pessoal.

À minha orientadora Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos pela competência ética e profissional na minha orientação nos trabalhos científicos e profissionais, e por acreditar no meu desenvolvimento profissional.

À Profa. Dra. Lúcia M. C. Alves que sempre me ajudou apoiando moralmente, mesmo em situações impossíveis.

Ao Dr. João Carlos que além de químico, técnico, amigo e profundo conhecedor de conceitos microbiológicos, meus agradecimentos pelos conhecimentos prestados.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Lemos pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos da graduação Érico e Irlan pela nossa grande amizade.

À Dra. Maria J. Valarini, Dr. Haroldo A. Pereira, Dra. Lúcia M. C. Alves e Dra. Maria I. T. Ferro pelas sugestões e correções da tese.

Aos meus amigos e amigas do LBMP, pela amizade, carinho, dúvidas resolvidas e prestadas durante o período que estive em Jaboticabal.

Aos amigos e colegas de trabalho do Departamento de Tecnologia e Biologia Aplicada.

Aos professores da FCAVJ, pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Universidade, pelos serviços prestados.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação pelos esclarecimentos fornecidos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Muito Obrigado!

Sumário

Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Summary	viii
I. Introdução	1
II. Revisão de Literatura	3
III. Material e Métodos	6
III.1. Cultivo de bactérias <i>B. elkanii</i> SEMIA 587	6
III.2. Extração de DNA Genômico	6
III.3. Quantificação do DNA genômico	7
III.3.1. Por espectrofotômetro	7
III.3.2. Em gel de agarose	8
III. 4. Construção da biblioteca de fosmídeo BE587	8
III.4.1. Reparo das extremidades dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo	8
III. 4.2. Seleção do tamanho dos insertos	9
III. 4.3. Eluição dos fragmentos reparados do gel	9
III. 4.4. Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo	10
III. 4.5. Reação de Ligação	10
III. 4. 6. Reação de empacotamento	11
III. 4. 7. Estocagem das células EPI100-T1 ^R	11
III. 4. 8. Preparo do inóculo de células EPI100-T1 ^R	12
III. 4. 9. Transfecção das células EPI100-T1 ^R	12
III. 4. 10. Coleta e Estoque dos clones de fosmídeos	13
III. 5. Cultivo dos fosmídeos BE587 em “Conjunto”	13
III. 5.1. Extração de DNA do Conjunto de clones de fosmídeo BE587	13
III. 6. Reação de Cadeia da Polimerase com os primers <i>nifA</i> , <i>nifH</i> , <i>nodM</i> e	14

<i>fixN</i>	
III. 7. Construção da sub-biblioteca de fosmídeo em vetor pUC19	15
III. 7.1. Cultivo do fosmídeo selecionado	15
III. 7.2. Extração de DNA de fosmídeo	15
III. 7.3. Fragmentação por quebra física	15
III. 7. 4. Precipitação do DNA	15
III. 7. 5. Reparo dos terminais dos fragmentos	16
III. 7. 6. Reação com Kinase	16
III. 7. 7. Obtenção dos fragmentos a partir do gel	17
III. 7. 8. Eluição dos fragmentos reparados e fosforilados do gel	17
III. 7. 9. Clonagem dos fragmentos de DNA nebulizados	18
III. 7.10. Transformação de células	18
III. 7. 11. Seleção dos clones transformados	19
III. 7.12. Cultivo dos clones da sub-biblioteca de fosmídeos	20
III.7.13. Extração de DNA em placa	20
III. 7.14. Quantificação do DNA em placa	21
III. 8. Construção da sub-biblioteca de fosmídeo em vetor pUC18	21
III. 8. 1. Fragmentação por digestão enzimática	21
III. 8. 2. Obtenção dos fragmentos em gel de agarose com baixo ponto de fusão	21
III. 8. 3. Eluição dos fragmentos do gel por kit	22
III. 8.4. Clonagem dos fragmentos de DNA nebulizados ou digeridos	22
III. 8.5. Transformação de células	22
III. 8.6. Seleção dos clones transformados	23
III. 9. Reação de Cadeia da Polimerase para seqüenciamento	23
III. 10. Preparo das amostras e seqüenciamento	25
III. 11. Análise do sequenciamento	25
IV. Resultados e discussão	26
IV. 1. Biblioteca plasmidial BE587	26
IV. 2. Biblioteca de fosmídeos BE587	26

IV. 3. PCR nos conjuntos de fosmídeos	27
IV. 4. PCR nas placas de fosmídeos	27
IV. 5. Sequenciamento das pontas de fosmídeos	29
IV. 6. Sequenciamento dos fosmídeos	30
IV. 7. Análise dos dados de sequenciamento	31
IV. 8. Comparação filogenética	33
IV. 9. Genes da Ilha simbiótica	35
IV. 10. Genes relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio	41
V. Conclusão	44
VI. Referências	59

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC1FOS-TNC™ (EPICENTRE)	11
Figura 2	Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pUC19DNA/Sma I (FERMENTAS).	18
Figura 3	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação de foscídeos, A: DNA de foscídeos da placa 4 com o “ <i>primer</i> ” <i>nifA</i> gerando um produto de 450 pb; B: DNA de foscídeos da placa 3 com o “ <i>primer</i> ” <i>nifH</i> gerando um produto de 223 pb; C: DNA de foscídeos da placa 8 com o “ <i>primer</i> ” <i>nodM</i> gerando um produto de 945 pb; D: DNA de foscídeos da placa 10 com o “ <i>primer</i> ” <i>fixN</i> gerando um produto de 553 pb. 1kb: padrão de tamanho molecular (Fermentas). Círculos indicam os foscídeos escolhidos para sequenciamento.	28
Figura 4	Perfil eletroforético de gel em campo pulsado, em agarose 1% e TBE 0,5 X. 1: padrão tamanho molecular 1Kb; 2: padrão de tamanho molecular 37 kb; 3 foscídeo 03F09 não digerido; foscídeo 03F09 digerido com HindIII (4) e BamHI (5); foscídeo 04H04 digerido com HindIII (6) e BamHI (7); foscídeo 08C01 digerido com HindIII (8) e BamHI (9); foscídeo 10C07 digerido com HindIII (10) e BamHI (11).	29
Figura 5	Gráfico representando as categorias das ORFs de BE587 seguindo as normas do banco Rhizobase.	33
Figura 6	Relacionamento filogenético entre diferentes rizóbios em diferentes genes. A: 16S rDNA; B: <i>fixA</i> ; C: <i>nifA</i> ; D: <i>nifH</i> e E: <i>nodZ</i> . Os números internos representam o valor de bootstrap. XF: <i>Xylella fastidiosa</i> ; <i>Mesorhizobium loti</i> (MAFF303099); <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (USDA110); <i>Sinorhizobium meliloti</i> (1021); <i>Rhizobium etli</i> (CFN42); <i>Rhizobium leguminosarum</i> (biovar <i>viciae</i> 3841); <i>Rhizobium</i> sp. (pNGR234ab); <i>Mesorhizobium loti</i> R7A; <i>Bradyrhizobium</i> sp BTai1;	

	<i>Bradyrhizobium</i> sp ORS278; <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571; <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA0009.	34
Figura 7	Gráfico representando as categorias das ORFs da região da Ilha Simbiotica de <i>B. japonicum</i> e das ORFs de <i>B. elkanii</i> .	38

Lista de Tabelas

Tabela 1	Seqüência dos “ <i>primers</i> ” para <i>nifA</i> , <i>nifH</i> , <i>nodM</i> e <i>fixN</i> e tamanho do produto de amplificação	14
Tabela 2	Condições de amplificação da PCR, utilizando os “ <i>primers</i> ” <i>nifA</i> , <i>nifH</i> , <i>nodM</i> e <i>fixN</i> e ciclagem.	14
Tabela 3	Seqüência dos “ <i>primers</i> ” para seqüenciamento e pontas de fosmídeo	24
Tabela 4	Condições de amplificação da PCR seqüenciamento de ponta de fosmídeos e clones da sub-biblioteca	24
Tabela 5	Esquema das reações de PCR com os <i>primers</i> utilizados com os conjuntos de DNA dos fosmídeos. “+” indica reação positiva e “-” indica reação negativa	27
Tabela 6	Relação com dados gerais gerados pelo projeto genoma parcial de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA587.	32
Tabela 7	Genes relacionados com nodulação e fixação de nitrogênio entre <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> , * indica o número de genes encontrados.	38
Tabela 8	Relação das ORFs de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 relacionados as ORFs da Ilha Simbiótica de <i>B. japonicum</i>	44
Tabela 9	Relação das ORFs da Ilha Simbiótica de <i>B.japonicum</i> .	51

Resumo: Bactérias simbiotes conhecidos como rizóbios interagem com raízes de leguminosas e induzem a formação de nódulos fixadores de nitrogênio. Em rizóbios, genes essenciais para simbiose são compartimentalizados em ilhas simbióticas ou em ilhas no cromossoma. Para o entendimento da estrutura e evolução dessas ilhas simbióticas, é necessário analisar seu contexto genético e sua organização. O genoma parcial de *B. elkanii* SEMIA 587 apresenta hoje um total de 5.821.111 pb seqüenciados contendo 62,6 % de GC em 3941 Contigs, onde foram identificados 5381 ORFs. Uma suposta ilha simbiótica foi localizada através da identificação de genes relacionados à fixação e nodulação em comparação à ilha simbiótica de *B. japonicum*, encontrando 267 ORFs em *B. elkanii*, onde 17 ORFs foram identificadas como transposases. Assim, através destes resultados parciais pode ser possível averiguar que *B. elkanii* provavelmente sofreu um rearranjo genético no cromossoma, já que ele apresenta um tamanho menor que *B. japonicum* em relação ao tamanho do genoma.

Palavras chave: Rizóbio, genoma, fixação de nitrogênio, ilha simbiótica.

SUMMARY - Symbiont bacteria, commonly known as rhizobia interact with root legume and induce the formation of Nitrogen-fixing nodules. Among rhizobia, essential genes for symbioses are compartmentalized either in symbiotic islands or in chromosomal islands. For better understanding of the structure and evolution of these symbiotic islands, it is necessary to analyze their genetic context and organization. The work had as objective to analyze genes related to the symbiotic island in the partial genoma of the *B. elkanii* strain 587 has 5.821.111 bp sequenced, containing 62,6 % of GC in 3941 Contigs, been identified 5381 ORFs. A purported symbiotic island was localized through of the identification of related genes of fixing nitrogen and nodulation in comparison with the symbiotic island of *B. japonicum*, founding 267 ORFs in *B. elkanii*, where 17 ORFs were identified as transposases. So through these partial results could be possible to infer that *B. elkanii* probably shows a symbiotic island with genetic rearrange into chromosome, because it showed lower genome size than *B. japonicum*.

Key words: rhizobia, genome, nitrogen-fixing, symbiotic islands.

I. INTRODUÇÃO

No Brasil os solos de Cerrado, que representam porção considerável da área de cultivo para soja, não possuem populações nativas de rizóbios capazes de nodular esta cultura. Por isso, a inoculação com essas bactérias é imprescindível para o bom desempenho da lavoura (VARGAS *et al.*, 1992; MENDES e HUNGRIA, 2001). Assim, desde 1979, as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 5019 e SEMIA 587, e depois de 1992, as de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e a SEMIA 5080, foram incluídas na recomendação oficial de inoculantes comerciais para a cultura da soja.

Bactérias com capacidade de promover simbiose, como rizóbios, têm oportunidade de sobreviver em dois nichos: na rizosfera e na planta hospedeira. Crescimento na rizosfera oferece freqüentes oportunidades para troca de informações genéticas com outras bactérias do solo, porém isso requer um alto grau de competitividade. Há crescentes evidências que a diversidade genômica é alta entre rizóbios como resultado da aquisição de DNA exógeno como também de freqüentes eventos de recombinação no genoma. Isto reflete adaptações na vida no solo e na rizosfera, que requer um alto nível de versatilidade metabólica. Estas bactérias, em contato com uma gama de outros microorganismos, acessam um conjunto de genes por via horizontal, resultando no desenvolvimento do complexo celular associado com simbiose (DOBRINDT *et al.*, 2004). Os processos de nodulação, diferenciação em bacteróide e fixação do nitrogênio envolvem então a expressão de genes do hospedeiro e do simbiote (KEEN, 1988; OKE e LONG, 1999).

Avanços na manipulação do DNA e seqüenciamento têm mudado drasticamente as estratégias para estudo da genética, fisiologia e bioquímica de vários organismos de vida livre, principalmente bactérias. Seqüenciamento de genomas no intuito de investigar funções de genes tem seu grau efetivo, porém a estrutura completa de um genoma tem seu alto grau de complicação.

Seqüenciamento completo de genomas é importante não só pela grande quantidade de informações que possibilita, necessárias para predizer uma análise funcional dos genes, mas também para realizar novos estudos do funcionamento de novos genes, evolução genética e genômica através da comparação dos genes bem como sua organização entre as espécies.

A fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico é um processo vital no ciclo de nitrogênio global e para as práticas na agricultura. O estabelecimento da simbiose planta-rizóbio requer a criação e desenvolvimento de técnicas funcionais. O foco principal dos estudos, tem sido o entendimento dos mecanismos que inclui simbiose, fisiologia, ecologia e genética de rizóbios

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a presença de uma ilha simbiótica (IS) em *Bradyrhizobium elkanii* em uma análise comparativa com o genoma de *Bradyrhizobium japonicum*, previamente seqüenciado. Para isto os seguintes objetivos específicos foram buscados:

1. Construção de uma biblioteca genômica de fosmídeos de *B. elkanii*;
2. Seleção de fosmídeos que contivessem os genes relacionados à fixação e nodulação, por PCR;
3. Sequenciamento de pontas de fosmídeos para seleção daqueles que se encontrassem na região da Ilha Simbiótica de *B. japonicum* através de análises por bioinformática;
4. Construção e sequenciamento de sub-bibliotecas selecionadas;
5. Identificação e anotação das possíveis ORFs (Open Read Frame);
6. Organização dos dados de seqüenciamento em bancos de dados e criação de interfaces para a realização das análises por bioinformática.

II. REVISÃO DE LITERATURA

B. japonicum USDA110 foi seqüenciado por KANEKO e colaboradores (2002a, 2002b), os quais descrevem uma bactéria com cromossomo circular único de 9,1Mb contendo 64,1% de GC e ausência de plasmídeos. O cromossomo compreende 8.317 genes potencialmente funcionais, um conjunto de genes rRNA e 50 genes tRNA, sendo que 54% dos genes funcionais mostraram homologia a genes de função conhecida, 30% foram hipotéticos e o restante (18%) não apresentaram similaridade com genes reportados.

Em *B. japonicum*, 34% dos genes mostraram similaridade aos reportados em *Mesorhizobium loti* e em *Sinorhizobium meliloti* já seqüenciados, enquanto que 23% dos genes do *B. japonicum* foram únicos para essa espécie (GÖTTFERT et al., 2001). Uma ilha simbiótica (IS) de 681kb, também foi identificada em *B. japonicum*, revelando 655 genes putativos codificadores de proteínas, e as funções de 301 genes, incluindo aqueles relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio. Na bactéria *B. japonicum* também foram identificados 167 genes que codificavam transposases, onde 100 desses genes localizam-se na possível ilha simbiótica. Segmentos específicos de DNA de 4 a 97kb inseridos em genes de tRNA foram encontrados em 14 locais do genoma, gerando duplicações parciais desses genes. Estas observações sugerem a plasticidade do genoma de *B. japonicum*, devida ao complexo rearranjo genômico bem como à transferência horizontal, inserção de elementos de DNA e recombinação homóloga.

O mapa genético físico parcial do genoma de *B. japonicum* estabelecido mostra que os genes *nod* e *nif* estão agrupados em uma região cromossômica de 400 kb (KÜNDING et al., 1993). Posteriormente, esta porção cromossômica teve sua seqüência de nucleotídeos revelada confirmando que nela estavam contidos todos os genes para nodulação e fixação de nitrogênio. Nesta região, 388 ORFs foram selecionadas como regiões codificadoras de proteínas, das quais 35% mostraram similaridade com proteínas comuns de rizóbios. Genes que codificam sistemas de transporte de citrato férrico, molibdato e fontes de carbono, além de proteínas externas

de membrana, sistemas de secreção do tipo III e enzimas modificadoras da parede celular também foram encontrados (GÖTTFERT *et al.*, 2001).

Em *S. meliloti*, mapas físicos do cromossomo (3,7Mb) e de dois plasmídeos simbióticos (1,7Mb e 1,4Mb) já foram elaborados por Capela e colaboradores (2001). Segundo KUNDING colaboradores (1993), em *Bradyrhizobium* e em *Mesorhizobium* a maioria dos genes está presente no cromossomo. Por outro lado, Kaneko e colaboradores (2000) relatam a presença de um único cromossomo (7Mb) e dois plasmídeos designados como pMLa (350kb) e pMLb (208kb) no genoma de *M. loti* (estirpe MAFF303099). O cromossomo contém 6752 prováveis genes funcionais, dois conjuntos de genes de rRNA e 50 genes de tRNA, representando 47 espécies de tRNA. Dos genes funcionais, encontrados em *M. loti*, 54% mostraram similaridade com genes de função conhecida, 21% a genes hipotéticos e o restante (25%) não apresentou similaridade aparente a nenhum gene relatado. Um segmento de DNA de 611kb, provavelmente uma ilha simbiótica, foi identificado, sendo que 30 genes para fixação de nitrogênio e 24 para nodulação foram encontrados nesta região.

A finalização do seqüenciamento de *S. meliloti* destacou a presença de três replicons no genoma dessa bactéria, a saber: um cromossomo de 3,7Mb (com 3 cópias de rDNA) e dois megaplasmídeos conhecidos como pSymA (1,4Mb) e pSymB (1,7Mb). O plasmídeo pSymA contém a maioria dos genes relacionados a nodulação e fixação do nitrogênio, conferindo a capacidade para a bactéria colonizar ambientes de baixa tensão de oxigênio e metabolizar uma variedade de formas químicas de nitrogênio, principalmente a forma molecular N₂ (GALIBERT *et al.* 2001).

Do mesmo modo em bactérias do gênero *Rhizobium*, o plasmídeo Sym contém a maioria dos genes responsáveis pela fixação do nitrogênio. Este plasmídeo contém um "operon" de três genes, *nod ABC*, cuja expressão é regulada pelo gene *nodD* induzido por flavonóides (DAZZO, 1984; REDMOND *et al.*, 1986). O seqüenciamento do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234 identificou a presença de 416 genes funcionais, incluindo 26 genes para nodulação e 26 genes para fixação do nitrogênio (FREIBERG *et al.*, 1997).

A comparação entre os genomas de *S. meliloti* e *M. loti*, da região cromossomal de 410 Kb de *B. japonicum* e do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. Permitiu

algumas conclusões, a saber: 1) 35% dos genes de *M. loti* não apresentam equivalentes em *S. meliloti*; 2) as informações genéticas carregadas nos plasmídeos pSymA e pSymB de *S. meliloti* encontram-se dispersas no genoma de *M. loti*; 3) *M. loti* contém ilhas simbióticas, além dos genes de nodulação e fixação de nitrogênio, que não têm equivalente em *S. meliloti*; 4) *S. meliloti* não apresenta um sistema de secreção do tipo III, comum aos outros gêneros; e 5) 54% dos genes do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. não apresentam equivalentes em *S. meliloti*. Tomadas juntas, estas observações indicam que rizóbios diferem significativamente quanto ao conteúdo e organização gênica, independente de suas relações taxonômicas e hábitos simbióticos (GALIBERT *et al.*, 2001).

A identificação de genes e a elucidação de mecanismos envolvendo os processos de infecção e nodulação por rizóbios, a diferenciação em bacteróide e fixação biológica de nitrogênio têm grande interesse agrônomo. Este conhecimento gera uma perspectiva excitante para o aproveitamento de plantas refratárias à nodulação, através da engenharia genética e transformação de plantas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Cultivo de bactérias *B. elkanii* SEMIA 587

O cultivo de *B. elkanii* SEMIA 587 foi realizado em meio triptona-levedura (TY, pH 6,8) (BERINGER, 1974) constituído por triptona, extrato de levedura e cloreto de cálcio, em concentração de 8,0; 5,0 e 2,5g/L, mantidas a 28°C, sob agitação constante (180 rpm) por 96 horas.

III.2. Extração de DNA Genômico

As células de *B. elkanii* SEMIA 587 cultivadas foram centrifugadas a 12000 xg por 30 minutos a 4°C, sendo a seguir, ressuspendidas em 1 mL de solução salina (0,85% NaCl). As suspensões foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 15600 xg por 5 minutos. Esta operação foi repetida mais uma vez para a remoção de resíduos do meio de cultivo.

Os peletes de células foram ressuspendidos em 1 mL de solução salina-EDTA (0,01M EDTA, 0,15 M NaCl, pH 8) e incubados a 37°C durante 10 minutos, em tubos Córax para centrifuga. Após esse período, adicionaram-se 500 µl de lisozima (5mg/mL) preparada em tampão Tris-EDTA-dextrose (10 mM EDTA, 24 mM Tris-HCl 50 mM Dextrose, pH 8), procedendo-se então uma nova incubação a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 500 µl de solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 20%, e novamente realizou-se uma incubação a 56°C durante 20 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados à suspensão, 500 µl de solução de perclorato de sódio 5M, gota a gota com agitação suave. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v), deixando-se por 1 hora em agitação orbital a 220 rpm a 8°C (banho de gelo). Após esse período de incubação, centrifugou-se o material a 12000 xg, por 20 minutos, a 4°C. Coletou-se então, com auxílio de uma pipeta, a fase superior transferindo-a para tubos Corex limpos.

Adicionou-se à fase recuperada, 2 mL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v:v), procedendo-se à uma agitação orbital por 20 minutos em 220 rpm a 8°C. O material foi centrifugado a 5860 xg por 20 minutos a 4°C, e após esse passo, procedeu-se à coleta da fase superior, a qual foi transferida novamente para tubos limpos. Mais uma vez adicionou-se 2 mL de clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo toda essa marcha, até a recuperação e transferência da fase superior para tubos limpos, aos quais foram adicionados 2 volumes de etanol 95% (gelado), agitando-se manualmente e incubando-se a -20°C por 12 horas.

Após esse período, centrifugou-se o material a 5860 xg por 20 minutos a 4°C, descartando-se então o sobrenadante. O precipitado foi lavado rapidamente (para evitar a perda do DNA) por duas vezes com 1 mL de etanol 70% (gelado).

Os tubos foram então invertidos sobre papel absorvente para eliminar o excesso de etanol. Adicionou-se 1 mL de tampão TE 10:1 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) (gelado) para a ressuspensão do DNA, o qual foi transferido para tubos tipo eppendorf estocados a -20°C. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro com uma absorbância de 260 nm.

III.3. Quantificação do DNA genômico

III.3.1. Por espectrofotômetro

Para a quantificação do DNA genômico fez-se uma diluição de 10X do DNA em água milli-Q. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Beckmann-Du 640-B, onde se utilizou o comprimento de onda 280 nm para se determinar possíveis contaminações do mesmo com proteína e/ou fenol. Otimizou-se o DNA quando a leitura da absorbância da relação 260/280 nm se apresentou na faixa entre 1,7 e 2,0. Para os cálculos da concentração do DNA, considerou-se o padrão de que uma unidade de absorbância a 260 nm equivalente a 50µg de DNA por mL de solução (SAMBROOK, et al,1989).

III.3.2. Em gel de agarose

A concentração do DNA foi avaliada através da comparação visual com a intensidade das bandas de pGEM (Applied Biosystems) contendo concentrações conhecidas de DNA e com padrão de tamanho molecular 1 Kb (Fermentas), por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal contendo tampão TBE 1X (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM; pH 8,3) com brometo de etídio (5 µg/ml), conduzidas à voltagem constante de 90 V, por 1 hora. As imagens foram registradas pelo sistema de documentação de géis GEL DOC1000 BioRad através da incidência de luz ultravioleta.

III.4. Construção da biblioteca de fosmídeo BE587

III.4.1. Reparo das extremidades dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo

A biblioteca de fosmídeo foi construída usando o kit CopyControl Fosmid Library (Epicentre – pCCFOS110). A reação de reparo das extremidades do DNA BE587 (~ 20 µg) foi realizada para que este pudesse ser ligado ao vetor. Como o vetor está aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, cujo corte gera extremidade abrupta, foi necessário realizar o reparo das extremidades do inserto.

Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*E. coli*) foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3' 5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'.

Para cada amostra contendo até 15 µg de DNA BE587, em um volume de 52 µL, foram acrescentados 8 µL de 10X “end repair buffer” (EPICENTRE), 8 µL de uma mistura de dNTPs, 8 µL de ATP 10 mM e 4 µL de “end repair enzyme” (EPICENTRE). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 45 minutos e em seguida a 75°C, por 20 minutos, para inativação das enzimas. Os tubos foram estocados a 4°C até serem utilizados.

III. 4.2. Seleção do tamanho dos insertos

Uma vez que os fragmentos de DNA BE587 foram reparados, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para separação das bandas e posterior recuperação dos insertos de tamanho desejado.

A seleção do tamanho do DNA foi feita através de eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Low Melt Preparative Grade – Biorad) 1% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com hipoclorito de sódio 4% (v/v).

Uma alíquota de 20 µL de DNA BE587 foi aplicada no gel e ao lado 100 ng do marcador de 36 Kb T7 control DNA (EPICENTRE). Foi deixada uma canaleta e na próxima foi aplicado todo o DNA. A amostra foi aplicada em um poço largo do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) isento de brometo de etídio, a voltagem constante 30 V por 8 horas.

Após a eletroforese descrita, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob um transiluminador. O padrão de bandejamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado foi marcada e cortada com o auxílio de uma lamínula, guardando em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml, aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4 °C até o momento do uso. O restante do gel foi corado, visualizado em luz UV e documentado em fotodocumentador (BIO RAD – GEL DOC 1000), através do programa Quantity OneR (BIO RAD™, HERCULES, CA, USA).

Foram realizados experimentos para recuperação de fragmentos de DNA entre 30 e 45 Kb, aproximadamente.

III. 4.3. Eluição dos fragmentos reparados do gel

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho

a 65°C durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500 µL, completando o volume com TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. O tampão da enzima gelase (10 µL) e a enzima gelase (3 µL) (EPICENTRE) foram adicionados aos tubos, que foram bem agitados e centrifugados rapidamente. As amostras foram incubadas em banho-maria a 45°C por 1 hora. Em seguida, a reação foi transferida para banho-maria a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. Igual volume de acetato de amônio 5 M foi adicionado, e em seguida o material foi centrifugado a 14.000 xg por 10 minutos para precipitação do material insolúvel.

Cuidadosamente, foram transferidos 95% (v/v) do sobrenadante para um tubo novo. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto, e recuperado por centrifugação a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C. Em seguida, foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado 14.000 xg por 15 minutos a 4°C. O DNA precipitado foi ressuspenso num volume total de 40 µL e quantificado em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM; pH 8,3), a voltagem constante de 90 V por 1 hora.

III. 4.4. Clonagem dos insertos em vetor fosmídeo

Para a construção da biblioteca BE587 foi utilizado o vetor pCC1FOS™ (EPICENTRE), que possui 8.139 pares de bases (Figura 1). Entre as características específicas deste vetor, podemos citar: origem de replicação *oriV* e fator-F para crescimento em *E. coli*; resistência a cloranfenicol, sítio *cos* de bacteriófago lambda para empacotamento, T7 Promoter flanqueando o sítio de clonagem.

III.4.5. Reação de Ligação

A ligação foi realizada mantendo uma relação de concentração de insertos de DNA BE587 com DNA vetor na proporção molar [1:10], relação esta exigida pelo kit.

A reação foi executada em um volume de 20 µL contendo 2 µL de inserto DNA BE587 (±0,2 µg), 1 µL de vetor pCC1FOS-TNC (0,5 µg/µL), 2 µL de tampão “fast-link ligation buffer” 10X (EPICENTRE), 1 µL de ATP 10 mM, 1 µL da enzima “fast link” DNA ligase (EPICENTRE) e 13 µL de H₂O Milli-Q estéril. A reação foi mantida a temperatura

ambiente (25°C) por 3 horas e depois a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima. Os fósídeos ligados ao inserto foram armazenados a -20 °C.

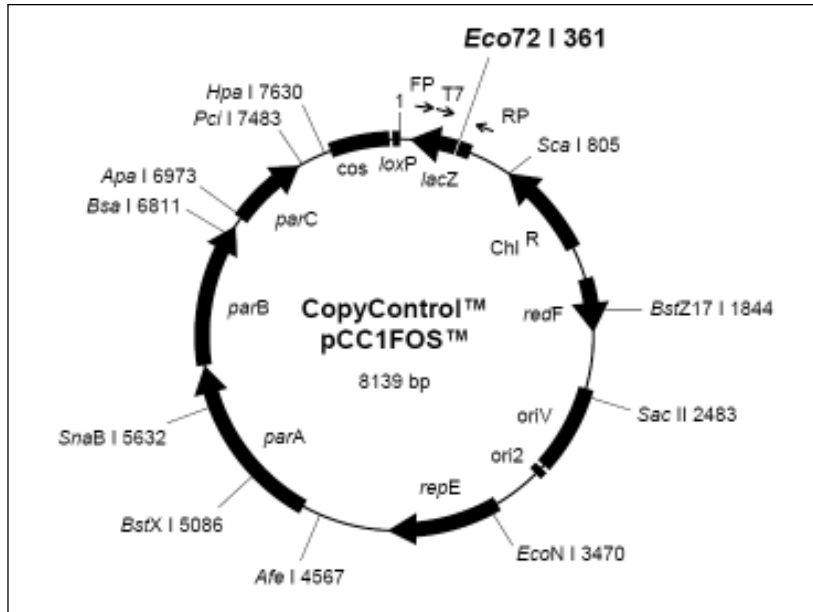


Figura 1. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pCC1FOS-TNC™ (EPICENTRE).

III. 4. 6. Reação de empacotamento

Um tubo de extrato de empacotamento MAXPLAX (EPICENTRE) com 50µL foi retirado do freezer -80 °C, para descongelar no gelo. Em cada tubo contendo os fósídeos ligados ao inserto foi adicionado 25 µL de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente e centrifugadas rapidamente, e depois incubadas em banho-maria a 30°C por 90 minutos. Passado esse período, foram adicionados mais 25 µL de extrato de empacotamento em cada tubo e as amostras foram novamente incubadas a 30°C por mais 90 minutos. Em seguida foi adicionado 500 µL de tampão de diluição de fagos [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂] e 25 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4°C.

III. 4. 7. Estocagem das células EPI100-T1^R

Tubos de estoque de células contendo 150 µL de glicerina-USP foram

autoclavados. Colônias isoladas foram obtidas através do cultivo em placas de petri com meio de cultura LB suplementado com 10 mM MgSO₄. Para reativação das células, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com uma colônia isolada, e as células foram cultivadas durante a noite a 37°C com agitação de 300 rpm. Na seqüência, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com 5 mL das células cultivadas durante a noite e cultivado sob a mesma agitação e período a 37°C. Após o crescimento, foi adicionado dentro do fluxo laminar 850 µL da cultura em cada tubo contendo glicerina. Os tubos foram agitados e congelados rapidamente com nitrogênio líquido, e em seguida estocados em freezer -80°C.

III. 4. 8. Preparo do inóculo de células EPI100-T1^R

Colônias isoladas foram obtidas através do cultivo em placas de petri com meio de cultura LB suplementado com 10 mM MgSO₄. No dia anterior a realização da reação de empacotamento, foram inoculados 50 mL de caldo LB suplementado com uma colônia isolada de células EPI100-T1^R. No dia da reação de empacotamento, 50 mL de caldo LB suplementado foi inoculado com 5 mL das células cultivadas durante 14 horas sob agitação a 37 °C até atingir a densidade ótica a 600 nm entre 0,8 e 1,0. A densidade óptica foi determinada no Biophotometer (EPPENDORF). As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso.

III. 4. 9. Transfecção das células EPI100-T1^R

Cada 10 µL da solução com os fosmídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI100-T1^R. Os tubos foram gentilmente agitados e incubados em estufa a 37°C, por 20 minutos. Após esse período, os 110 µL de cada um dos tubos foram aplicados em placa de petri contendo meio de cultura LB com cloranfenicol (12,5 µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C. Como controle positivo, células EPI100-T1^R sem vetor foram cultivadas em meio sem antibiótico, e como controle negativo as células EPI100-T1^R sem vetor foram colocadas em placas de petri contendo meio LB com 12,5 µg/mL cloranfenicol .

III. 4. 10. Coleta e Estoque dos clones de foscímídeos

Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio CG acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 125 µL de solução de glicerol 40% (v/v) e estocadas à -80°C.

Alguns foscímídeos foram escolhidos para determinar o tamanho médio dos insertos através de enzimas de restrição (BamHI e HindIII), visualizados em gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE). O tamanho dos insertos foi calculado utilizando o programa DNAFrag 3.03 (SCHAFFER and SEDEROFF, 1981).

III.5. Cultivo dos foscímídeos BE587 em “Conjunto”

Para cada placa de foscímídeo, foram inoculados em placas “deep-well” contendo 1,2 mL do meio “Circle Grow” (BIO 101, Inc; Cat. No. 3000-142) mais cloranfenicol (12,5 µg/mL) e incubadas com agitação (280 rpm), a 37°C, por 22 horas.

Após a incubação, os clones de cada placa foram homogeneizados em uma única amostra e centrifugados a 12000 xg por 15 minutos a 4°C, dividindo no final o sedimento em 4 tubos tipo eppendorf, obtendo assim um Conjunto de clones para cada placa de foscímídeos BE587, estocados a -20 °C.

III.5.1. Extração de DNA do Conjunto de clones de foscímídeo BE587

Um tubo tipo eppendorf contendo o Conjunto de clones de foscímídeo BE587 foi submetido à extração de DNA por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). O pelete celular foi suspenso em tubos córex em 1,7 mL de GTE (50 mM Glicose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) agitando em vórtex, adicionando em seguida 3,4 mL de SDS (0,2 N NaOH, 1 % SDS) agitando os tubos gentilmente por inversão e incubando por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de Acetato de Potássio 3M (pH 4,8), agitando gentilmente e incubando por mais 5 minutos, centrifugando em seguida por 12000 xg por 5 minutos a 4 °C (SORVAL). O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e o DNA precipitado com 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto. Esse material foi incubado a -80 °C por 20 minutos,

centrifugado por 12000 xg por 20 minutos a 4 °C, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco e ressuspendido em 200 µL de TE 10:1 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5).

O material foi devidamente quantificado como no item III.3.2.

III. 6. Reação de Cadeia da Polimerase com os *primers nifA, nifH, nodM e fixN*

Nas reações de amplificação com DNA do Conjunto de fosmídeo BE587 foram utilizados “primers” específicos para os genes *nifA*, *nifH*, *nodM* e *fixN* sintetizados pela BIOSYNTHESIS, para identificar regiões relacionadas aos genes de fixação e nodulação. As seqüências dos “primers” estão descritas na tabela 1, as condições da reação de PCR estão descritas na tabela 2 e os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (item III.3.1.2).

Tabela 1: Seqüência dos “*primers*” para *nifA*, *nifH*, *nodM* e *fixN* e tamanho do produto de amplificação

Primer	Seqüência	Produto
NifAF	CCC CGT TCC AGG CTA AGT T	~ 450 pb
NifAR	TAC TTT TCC ACA GCA TCG C	
NifHF	TCC TTG TAG CCG ACC TTC A	~ 223 pb
NifHR	TAC GGA AAA GGC GGC ATC G	
NodMF	CGT CCG TCC CCA TAA CCA C	~ 945 pb
NodMR	GCC GCT CAC ACT ACC GTT C	
FixNF	GCC GAC CGA ACT ACA ATC T	~ 553 pb
FixNR	CGA ACC GAA CAC CGA TAC C	

Tabela 2: Condições de amplificação da PCR, utilizando os “*primers*” *nifA*, *nifH*, *nodM* e *fixN* e ciclagem.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (CLONE)	CONCENTRAÇÃO FINAL (POOL)
DNA	~ 60 ng	~ 300 ng
Tampão da enzima	1X	1X
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
DNTPs	200 µM	350 µM
Taq DNA polimerase	1,25 U	2,5 U
<i>primers</i>	10 pmol	60 pmol
Volume final (água MilliQ)	20 µL	20 µL

Programas utilizados no Termociclador:	
<i>nifA – nifH - fixN</i>	<i>nodM</i>
1) 94 °C – 5 min.;	1) 94 °C – 5 min.;
2) 94 °C – 1 min.;	2) 94 °C – 1 min.;
3) 58 °C – 1 min. 30seg.;	3) 62 °C – 1 min. 30seg.;
4) 72 °C – 2 min.;	4) 72 °C – 2 min.;
5) 40 ciclos etapas 02 a 04;	5) 40 ciclos etapas 02 a 04;
6) 72 °C – 5 min.;	6) 72 °C – 5 min.;
7) 4 °C por tempo inderteminado.	7) 4 °C por tempo inderteminado.

III. 7. Construção da sub-biblioteca de foscídeo em vetor pUC19

III.7.1. Cultivo do foscídeo selecionado

O cultivo do foscídeo selecionado foi realizado em 25 mL de meio “Cirvle Grow” contendo cloranfenicol (12,5 µg/mL) mais 25 µL da solução de indução, e incubadas com agitação (280 rpm), a 37°C, por 16 horas.

III.7.2. Extração de DNA de foscídeo

A extração de DNA de foscídeo foi realizada como no item III.5.1, e quantificadas como no item III.3.2.

III. 7.3. Fragmentação por quebra física

Foi utilizado em torno de 50 µg de DNA fosmidial em um nebulizador contendo tampão Tris-HCl (1M pH 8,0), MgCl₂ (1M), glicerol esterilizado (50%), água filtrada e esterilizada (q.s.p. 2 mL). A nebulização foi realizada por 25 segundos a 3kgf/cm² com nitrogênio. As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 2 minutos, a 12.000 xg para concentrar o material no fundo do nebulizador.

III. 7. 4. Precipitação do DNA

O DNA fragmentado foi separado em tubos tipo eppendorf de 1,5mL (máximo de 400 µL de DNA). Foi acrescentado 0,1 volume de Acetato de sódio 3M, pH 5,2

misturando levemente, adicionando em seguida 2,5 volumes de etanol 95% (temperatura ambiente). Os tubos foram incubados a -80°C por 20 minutos, procedendo a uma centrifugação a 15.294 xg, por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, lavando as amostras com 1 mL de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi realizada a 15.294 xg por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi novamente descartado por inversão secando a temperatura ambiente. A amostra foi ressuspensa em 44 μL de tampão TE.

III. 7. 5. Reparo dos terminais dos fragmentos

Para cada amostra contendo 44 μL de DNA, foi acrescentado 50 mM MgCl_2 , 0,5 mM de dNTP e 9 U de DNA polimerase bacteriófago T4 (Biolabs). O material foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos, e foi adicionado em seguida 2 μL (10U) de fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli*. Procedeu-se outra incubação em temperatura ambiente por mais 15 minutos, adicionando 40 μL de água e 100 μL de uma solução 1:1 (v:v) de fenol/clorofórmio à temperatura ambiente (fenol saturado com 0,1 M Tris-HCl, pH 8). A mistura foi agitada em “vortex” por 1 minuto, centrifugada a 15.294 xg por 2 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um outro tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, adicionando-se 0,1 volume de 1M NaCl e 2,5 volumes de etanol absoluto, o material foi misturado por inversão, e em seguida a amostra foi deixada em freezer -80°C por 30 min. O material foi novamente centrifugado a 12.000 xg por 30 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. O material foi novamente centrifugado a 12.000 xg, por 15 minutos, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado deixando o resíduo seco. O material foi ressuspensa em 46 μL de água filtrada e esterilizada.

III. 7. 6. Reação com Kinase

O DNA reparado foi adicionado 20 mM ribo ATP, 10U de polinucleotídeo Kinase do bacteriófago T4, tampão polinucleotídeo Kinase do bacteriófago T4 (Biolabs) e 100 mM de DTT. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação foi inativada por tratamento com calor a 65°C , por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 2

μL de tampão de corrida (40% de glicerol e 0,02% de azul de bromofenol) para cada 20 μL de DNA) procedendo a uma eletroforese por 2 horas a 90 V em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Agarose Prep – Pharmacia Biotech) a 0,8% em tampão TBE 1X (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM; pH 8,3) sem brometo de etídio.

III. 7. 7. Obtenção dos fragmentos a partir do gel

Um corte vertical foi realizado entre os poços que continham o marcador de tamanho molecular e uma pequena amostra do material nebulizado, resultando dois fragmentos de gel, uma com o material fragmentado e outra com o marcador e amostra para visualizar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio, e sob um transiluminador, foi marcada com pequenos cortes a região do tamanho de fragmento desejado (de 1000 a 3000 pb). O gel corado foi colocado ao lado do gel com o material reparado, e com auxílio de uma lamínula foi cortada a região que continha o material reparado na região do tamanho de interesse, colocando o gel cortado em tubos tipo “eppendorf” (aproximadamente 400 mg de gel/tubo).

III. 7. 8. Eluição dos fragmentos reparados e fosforilados do gel

Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho a 65°C durante 15 minutos. Cada amostra teve seu volume igualado a 500 μL , completando o volume com TE (10:1) pH 8,0, quando necessário. Foram realizadas extrações sucessivas com um volume de fenol (saturado com 0.1 M Tris-HCl pH8), posteriormente com fenol saturado com 0,1 M Tris-HCl pH8:clorofórmio (1:1,v:v) e outra com clorofórmio. Cada mistura foi agitada em “vórtex” por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 15294 xg, à temperatura ambiente, para recuperação da fase aquosa. Os insertos foram precipitados com 0,1 volume de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, e 2 volumes de etanol absoluto gelado. A amostra foi incubada durante a noite a -20°C. O tubo contendo o DNA precipitado foi centrifugado a 15294 xg por 30 minutos, a 4°C. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado para limpeza do precipitado, sendo efetuada uma nova centrifugação a 15294 xg por 15 minutos a 4°C. O pellet obtido foi seco à temperatura ambiente, e ressuspendido em 10 μL de água Milli-Q esterilizada. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% (p/v) para checagem

do tamanho dos fragmentos obtidos e quantificação, na presença de pGEM (APPLIED BIOSYSTEMS).

III. 7. 9. Clonagem dos fragmentos de DNA nebulizados

Os fragmentos de DNA nebulizado foram clonados em vetor pUC19/SmaI (Fermentas)(Figura 2), conforme as instruções do fabricante. A reação de ligação dos fragmentos ao vetor foi realizada com 1 μ L de T4 DNA ligase (3U/ μ L), 2 μ L de tampão de T4 ligase (Biolabs), 100 ng do vetor e aproximadamente 400 ng de DNA, para uma reação com volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 16 °C aproximadamente 12 horas.

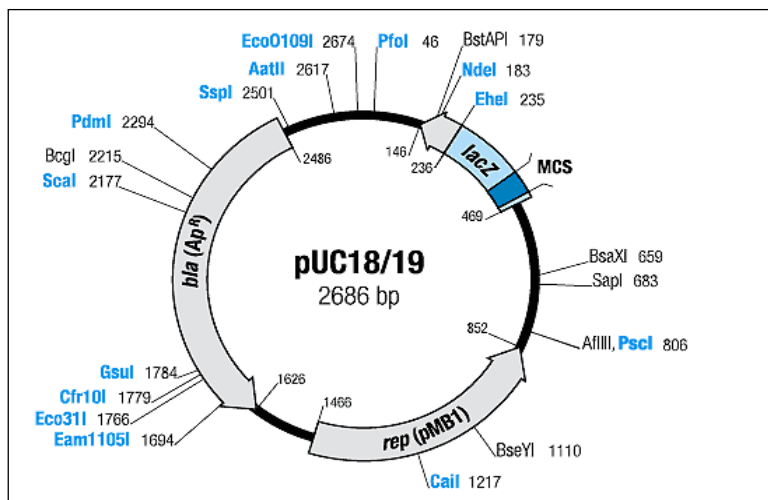


Figura 2. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pUC19DNA/Sma I (FERMENTAS).

III. 7.10. Transformação de células

As células competentes de *Escherichia coli* DH5 α utilizadas para transformação foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV-Jaboticabal.

Para reação de ligação foram preparadas placas de petri de 14 cm contendo meio LB/Ampicilina/IPTG/X-GAL. O meio LB (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L

e NaCl 10 g/L, ágar 15 g/L, pH 7,5) foi autoclavado a 120°C, durante 20 minutos e, após resfriamento foi adicionado ampicilina (50 mg/mL) para uma concentração final de (50 ug/mL) e este foi acondicionado nas placas de petri. Após a solidificação do meio, 100 uL de IPTG (0,24 g dissolvidos em 5 mL de água) esterilizado por filtração e 100 uL de X-GAL (0,05 g dissolvidos em 1 mL de N'N' dimetil formamida) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de "Drigalski" esterilizada. As placas foram mantidas a 37°C até o momento do uso.

Em tubos do tipo "Falcon", de 15 mL, foi adicionado 10 µL de DNA ligado com o vetor. Nesse momento, as células competentes (*E. coli* DH5α) foram removidas da temperatura -85°C e colocadas em banho frio por 5 minutos, misturando-se gentilmente. As células foram adicionadas (200 µL) aos tubos com DNA misturando-se gentilmente e incubadas em banho de gelo por 20 minutos. Os tubos foram levados ao banho-maria a 42°C sem agitação, por 1 minuto e 30 segundos. Após esse período, os tubos foram retornados ao gelo, por 2 minutos, adicionando, após isso, 1 mL de meio SOC [Tryptona (20g/L), Extrato de Levedura (5g/L), NaCl (0,5g/L), KCl 1M, MgCl₂ 1M e Glicose 1M] no tubo. Os tubos foram incubados a 37°C, com agitação de 150 xg, durante 2 horas.

Após o cultivo das células, 100 µL da cultura transformada foram plaqueadas, espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C por 20 horas e, após este período, as placas foram mantidas a 4°C para facilitar a visualização e a seleção de colônias.

III. 7. 11. Seleção dos clones transformados

Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca. A inserção do fragmento de DNA se dá na região do gene *lacZ*, responsável pela síntese de β-galactosidase que quebra o subestrato X-gal, originando coloração azul. Portanto, as células que receberam o inserto formam colônias brancas e as que não receberam, formam colônias azuis. Os clones transformados foram transferidos com palitos de madeira (autoclavados) para placas estéreis de poliestireno para cultivo de bactérias (96 "well assay plate" de 150 µL cada poço) contendo 150 µL de meio "Circle Grow" com ampicilina (50mg/mL). As placas foram incubadas em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) por 24 horas. Após esse período, foi adicionado 100 µL de

solução de glicerol 40%. Constituindo o estoque da sub-biblioteca de clones, mantidas a -85°C para posterior extração de DNA plasmidial, quantificação e seqüenciamento dos clones.

III.7.12. Cultivo dos clones da sub-biblioteca de fosmídeos

Para cada placa de fosmídeo foram inoculadas em placas “deep-well” contendo 1,2 mL do meio “Circle Grow” mais ampicilina (50 mg/mL). As placas foram incubadas com agitação (280 rpm), a 37°C , por 22 horas.

III.7.13. Extração de DNA em placa

Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 5 minutos e o pelete foi ressuspenso em 240 μL de solução GTE [Glicose 50mM; Tris-HCl 23mM (pH 8,0); EDTA 10mM], agitando em “vortex” até que as células estivessem em suspensão. O material obtido das 3 placas de cultivo foi reunido por centrifugação a 3220 xg por 8 minutos e 30 segundos.

Em seguida, foi adicionado 80 μL de solução de GTE contendo 5 μg de ribonuclease A. As placas foram agitadas em “vórtex” e um volume de 60 μL de cada amostra, foi transferido para microplacas de polipropileno de fundo redondo. Às amostras foram misturadas 60 μL de solução de lise (NaOH 0,2N/ SDS 1%) procedendo-se de, incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, 80 μL de acetato de potássio 3M foram adicionados e novo período de incubação foi realizado por 10 minutos, em temperatura ambiente, em seguida as placas foram mantidas por 30 minutos a 90°C . As placas foram resfriadas em gelo, por 5 minutos e centrifugadas por 8 minutos e 30 segundos a 3220 xg, a 20°C . Todo o material foi removido para placas de filtro Millipore e acopladas em placas de polipropileno novas sendo esse conjunto de placas forma centrifugadas por 5 minutos a 3220 xg, a 20°C . Ao material filtrado foi adicionado 100 μL de isopropanol absoluto. O material foi misturado 30 vezes por inversão e as placas foram centrifugadas a 3220 xg por 45 minutos, à 20°C . O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% gelado. As placas foram centrifugadas por 5 minutos nas mesmas condições de rotação e temperatura já descritas. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o

resíduo seco em temperatura ambiente por 30 minutos. O DNA foi suspenso em 30 μ L de água MilliQ autoclavada e estocado a -20°C .

III.7.14. Quantificação do DNA em placa

O material resultante da extração de DNA em placa foi quantificado como no item III.3.2.

III. 8. Construção da sub-biblioteca de fosmídeo em vetor pUC18

III. 8. 1. Fragmentação por digestão enzimática

O DNA do fosmídeo selecionado e quantificado foi realizado uma reação de digestão contendo cerca de 1 μ g de DNA, 5 unidades de *Sau3AI* (Jena Bioscience) com respectivo tampão em um volume final de 20 μ L, encubando a uma temperatura de 37°C por 10 minutos. Inativando em seguida a 65°C por 10 minutos.

III. 8. 2. Obtenção dos fragmentos em gel de agarose com baixo ponto de fusão

Foi adicionado 2 μ L de tampão de corrida (40% de glicerol e 0,02% de azul de bromofenol) para cada 20 μ L de DNA) procedendo a uma eletroforese por 2 horas a 90 V em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Agarose Prep – Pharmacia Biotech) a 0,8% em tampão TBE 1X (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA 2,5mM; pH 8,3) sem brometo de etídio.

Um corte vertical foi realizado entre os poços que continham o marcador de tamanho molecular e uma pequena amostra do material digerido, resultando dois fragmentos de gel, uma com o material digerido e outra com o marcador e amostra para visualizar. A porção do gel que continha o marcador foi corado com brometo de etídio, e sob um transiluminador, foi marcada com pequenos cortes a região do tamanho de fragmento desejado (de 1000 a 3000 pb). O material corado foi colocado ao lado do gel com o material reparado e com auxílio de uma lamínula foi cortada a região que continha o material reparado na região de interesse, colocando o gel cortado em tubos tipo eppendorf (aproximadamente 400 mg de gel/tubo).

III. 8. 3. Eluição dos fragmentos do gel por kit

Foi utilizado o kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf) para eluir os fragmentos contidos nos bloquinhos de gel de agarose de baixo ponto de fusão. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,0% (p/v) para checagem do tamanho dos fragmentos obtidos e quantificação, na presença de pGEM (APPLIED BIOSYSTEMS).

III. 8.4. Clonagem dos fragmentos de DNA nebulizados ou digeridos

Os fragmentos de DNA digerido com enzima foram clonados em vetor pUC18/BamHI (Amersham Pharmacia). A reação de ligação dos fragmentos ao vetor foi realizada com 1 μ L de T4 DNA ligase (3U/ μ L), 2 μ L de tampão de T4 ligase (Biolabs), 100 ng do vetor e aproximadamente 400 ng de DNA, para uma reação com volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 16 °C aproximadamente 12 horas.

III. 8.5. Transformação de células

As células competentes de *Escherichia coli* DH5 α utilizadas para transformação foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV-Jaboticabal.

Para reação de ligação foram preparadas placas de petri de 14 cm contendo meio LB/Ampicilina/IPTG/X-GAL. O meio LB (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L, ágar 15 g/L, pH 7,5) foi autoclavado a 120°C, durante 20 minutos e, após resfriamento foi adicionado ampicilina (50 mg/mL) para uma concentração final de (50 μ g/mL) e este foi acondicionado nas placas de petri. Após a solidificação do meio, 100 μ L de IPTG (0,24 g dissolvidos em 5 mL de água) esterilizado por filtração e 100 μ L de X-GAL (0,05 g dissolvidos em 1 mL de N'N' dimetil formamida) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de "Drigalski" esterilizada. As placas foram mantidas a 37°C até o momento do uso.

Em tubos do tipo "Falcon", de 15 mL, foi adicionado 10 μ L de DNA ligado com o vetor. Nesse momento, as células competentes (*E. coli* DH5 α) foram removidas da temperatura -85°C e colocadas em banho frio por 5 minutos, misturando-se gentilmente. As células foram adicionadas (200 μ L) aos tubos com DNA misturando-se gentilmente e

incubadas em banho de gelo por 20 minutos. Os tubos foram levados ao banho-maria a 42°C sem agitação, por 1 minuto e 30 segundos. Após esse período, os tubos foram retornados ao gelo, por 2 minutos, adicionando, após isso, 1 mL de meio SOC [Tryptona (20g/L), Extrato de Levedura (5g/L), NaCl (0,5g/L), KCl 1M, MgCl₂ 1M e Glicose 1M] no tubo. Os tubos foram incubados a 37°C, com agitação de 150 xg, durante 2 horas.

Após o cultivo das células, 100 µL da cultura transformada foram plaqueadas, espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas a 37°C por 20 horas e, após este período, as placas foram mantidas a 4°C para facilitar a visualização e a seleção das colônias de interesse.

III. 8.6. Seleção dos clones transformados

Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca. A inserção do fragmento de DNA se dá na região do gene *lacZ*, responsável pela síntese de β-galactosidase que quebra o substrato X-gal, originando coloração azul. Portanto, as células que receberam o inserto formam colônias brancas e as que não receberam, formam colônias azuis. Os clones transformados foram transferidos com palitos de madeira (autoclavados) para placas estéreis de poliestireno para cultivo de bactérias (96 “well assay plate” de 150 µL cada poço) contendo 150 µL de meio “Circle Grow” com ampicilina (50mg/mL). As placas foram incubadas em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) por 24 horas. Após esse período, foi adicionado 100 µL de solução de glicerol 40%. Constituindo o estoque da sub-biblioteca de clones, mantidas a -85°C para posterior extração de DNA plasmidial III.7.13, quantificação III.3.2 e seqüenciamento dos clones.

III. 9. Reação de Cadeia da Polimerase para seqüenciamento

Para o seqüenciamento das pontas de fosmídeo e dos clones da sub-biblioteca foram utilizados os “primers” descritos na tabela 3 e sob condições de PCR descritas na tabela 4.

Após a amplificação, o material foi adicionado 80 µL de isopropanol 75% deixando em temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, as placas foram centrifugadas durante 45 minutos a 15°C, a 3220 x g, e os sobrenadantes descartados.

As placas foram invertidas e secas em papel absorvente. Em seguida, 200 μL de etanol 70% foi adicionado em cada amostra e estas centrifugadas por 5 minutos a 15°C, a 3220 $\times g$, os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas em papel absorvente. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, e aplicadas no seqüenciador.

Tabela 3: Seqüência dos “*primers*” para seqüenciamento e pontas de fosmídeo.

Primer	Seqüência
M13/pUCF1211	GTAAAACGACGGCCAGT
M13/Pucr1201	AACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
RP2	TACGCCAAGCTATTTAGGTGAGA

Tabela 4: Condições de amplificação da PCR seqüenciamento de ponta de fosmídeos e clones da sub-biblioteca

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL (CLONE)	CONCENTRAÇÃO FINAL (PONTA)
DNA	~ 100 ng	~ 2 - 3 μg
Tampão	6 μL	4 μL
Eterminator (GE)	1 μL	4 μL
<i>primers</i>	3,2 pmol	10 pmol
Água MilliQ	-	-
Volume final	20 μL	20 μL

Programas utilizados no Termociclador:

DYNAMIC (CLONES)	GENOMA3 (PONTA)
1) 95 °C – 20 seg.;	1) 96 °C – 2 min.;
2) 50 °C – 15 seg.;	2) 96 °C – 30 seg.;
3) 60 °C – 1 min.;	3) 52 °C – 30seg.;
4) 40 ciclos etapas 01 a 03;	4) 60 °C – 4 min.;
	5) 40 ciclos etapas 02 a 04;

III. 10. Preparo das amostras e seqüenciamento

Nas placas a serem seqüenciadas foram adicionados 9 µL de HiDiFormamida (Applied Biosystems) em cada amostra, estas foram desnaturadas em a 95°C por 5 minutos, resfriadas para ser seqüenciado no ABI 3700 (Applied Biosystems).

III. 11. Análise do seqüenciamento

Após o seqüenciamento das amostras os dados foram analisados pelo programa “Sequencing Analysis 3.4” a montagem das seqüências e a verificação da qualidade das bases dos eletroferogramas foram realizadas pelo pacote PhredPhrap/Consed (EWING e GREEN, 1998; GORDON 1998), considerando seqüências com mais que 400 pb e qualidade phred maior ou igual 20. As seqüências obtidas foram comparadas pelo programa BLAST (ASTSCHUL et al 1997) nos bancos de dados do GenBank e Rhizobase.

O “software” Módulo de identificação de genes (CANTÃO et al., 2007) foi utilizado para identificar possíveis ORFs no consenso dos foscídeos comparando com o banco de proteínas de *Bradyrhizobium japonicum* presente no servidor LBMP (<http://lbmp.fcav.unesp.br>) onde “scripts” foram utilizados para filtrar os resultados e organizar em banco MySQL no próprio servidor LBMP, podendo realizar assim uma pré-anotação e categorização automática das ORFs identificadas nos foscídeos.

As seqüências do genoma BE587 foram montadas através do pacote Sabiá (ALMEIDA, et al., 2004) com seqüências de “shotgun” e com os foscídeos selecionados para o seqüenciamento (<http://lbmp.fcav.unesp.br/be587>).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. 1. Biblioteca plasmidial BE587

A partir do DNA genômico de *B. elkaii* SEMIA587, foram gerados fragmentos de DNA em condições de nebulização. Sob pressão de 3 Kgf/cm² de gás nitrogênio, durante 25 segundos, foram gerados fragmentos predominantes entre cerca de 506 pb e 2000 pb clonados em vetor pUC19/*Sma*I.

O seqüenciamento genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 teve início no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) a partir de 2002, quando foram contabilizados 9024 clones de bibliotecas de “shotgun”, tendo continuidade com o trabalho de doutorado de SOUZA (2006), onde bibliotecas de “shotgun” BE587 foram ampliadas em 16070 clones, atingindo um montante de 25094 clones. Estas bibliotecas foram geradas nos seguintes plasmídeos: pUC18/*Bam*HI, pUC18/*Sma*I, pUC19/*Sma*I e pCR[®]4Blunt-TOPO, utilizando como hospedeiro *E. coli* DH5 α .

IV. 2. Biblioteca de fosmídeos BE587

A bactéria *B. japonicum* apresenta genoma com tamanho de 8,5 Mb e a homologia 16S rDNA com *B. elkanii* é de 97%. Dados preliminares de eletroforese de campo pulsado com DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, no LBMP, mostram que seu genoma varia entre 7 a 8 Mb (KISHI et al., 2005).

Assim a partir do DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 foi obtida uma biblioteca com 6000 fosmídeos com insertos variando entre 30 – 45 kb, estocadas em glicerol 40% em placas de 96 pocinhos em freezer a -80 °C.

IV. 3. PCR nos conjuntos de fosmídeos

O DNA de 24 conjuntos de fosmídeos contendo cada um 96 clones foi usado para a pesquisa dos genes de interesse através da reação de PCR. Assim

os genes *nifH*, *nifA*, *nodM* e *fixN* foram pesquisados nos conjuntos de DNA (Tabela 5).

Tabela 5: Esquema das reações de PCR com os “*primers*” utilizados com os conjuntos de DNA dos fósmites. “+” indica reação positiva e “-” indica reação negativa.

<i>primer</i>	Conjunto de DNA de fósmites																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
NifA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NifH	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NodM	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
FixN	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A tabela 5 mostra a relação dos conjuntos de fósmites que apresentaram reação de PCR positiva para os genes de interesse quando comparados com a PCR realizada utilizando-se DNA de *B. elkanii*. Assim foi selecionado o conjunto da placa 4 para o gene *nifA*, conjunto da placa 3 para o gene *nifH*, conjunto da placa 8 para o gene *nodM* e o conjunto da placa 10 para o gene *fixN*.

IV. 4. PCR nas placas de fósmites

As placas selecionadas dos conjuntos de DNAs dos fósmites foram recultivadas e cada um dos clones foi avaliado por PCR buscando quais teriam os genes individuais através da presença de uma banda contendo o tamanho esperado de amplificação para cada primer. (Figura 3).

Para averiguar o tamanho dos insertos, alguns fósmites foram digeridos com BamHI e HindIII, visualizados em gel de eletroforese em campo pulsado, como mostra a figura 4.

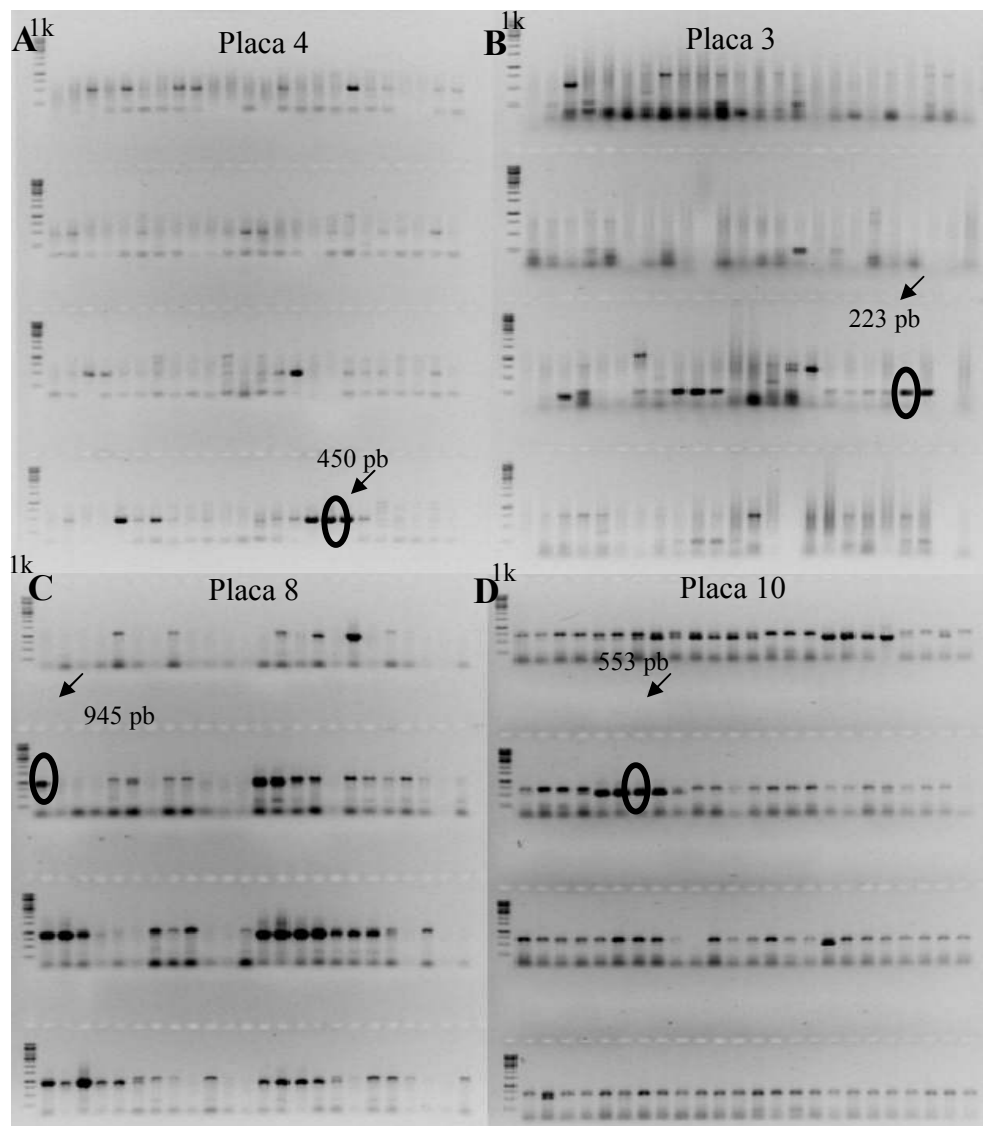


Figura 3: Perfil eletroforético dos produtos de amplificação de fosmídeos, A: DNA de fosmídeos da placa 4 com o “*primer*” *nifA* gerando um produto de 450 pb; B: DNA de fosmídeos da placa 3 com o “*primer*” *nifH* gerando um produto de 223 pb; C: DNA de fosmídeos da placa 8 com o “*primer*” *nodM* gerando um produto de 945 pb; D: DNA de fosmídeos da placa 10 com o “*primer*” *fixN* gerando um produto de 553 pb. 1kb: padrão de tamanho molecular (Fermentas). Círculos indicam os fosmídeos escolhidos para seqüenciamento.

Após a identificação destes clones o DNA de 4 foscídeos individuais denominados 04H05, 03F09, 08C01 e 10C07 foram escolhidos para o seqüenciamento.

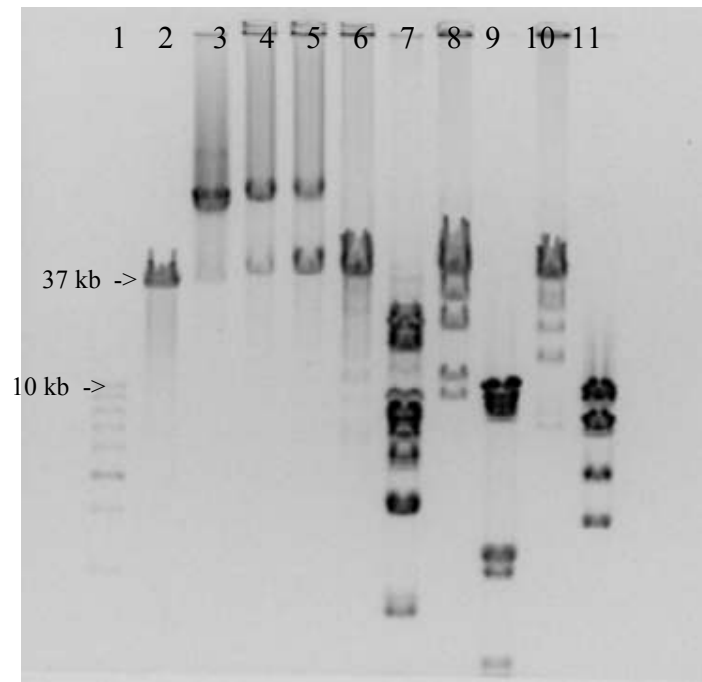


Figura 4: Perfil eletroforético de gel em campo pulsado, em agarose 1% e TBE 0,5 X. 1: padrão tamanho molecular 1Kb; 2: padrão de tamanho molecular 37 kb; 3 foscídeo 03F09 não digerido; foscídeo 03F09 digerido com HindIII (4) e BamHI (5); foscídeo 04H04 digerido com HindIII (6) e BamHI (7); foscídeo 08C01 digerido com HindIII (8) e BamHI (9); foscídeo 10C07 digerido com HindIII (10) e BamHI (11).

A digestão com as enzimas de restrição mostrou que os foscídeos tinham tamanho molecular entre 30-35 Kb, tamanho esperado para este tipo de construção.

IV. 5. Seqüenciamento das pontas de foscídeos

Com a extração de DNA de 8 placas da biblioteca BE587 para o seqüenciamento das pontas dos foscídeos obteve-se um rendimento de em torno de 80% de aproveitamento quando analisados seqüências com 400 pb e qualidade phred de 20.

As seqüências das pontas dos foscímicos foram comparadas por busca de similaridade na região da ilha simbiótica de *B. japonicum*, verificando a similaridade dos clones, quando seqüenciados com o primer "T7" e "RP2" na região, assim foram selecionados os foscímicos 02A07, 03A02, 05E08, 15G08, 04G11 e 06G11 para o seqüenciamento.

IV. 6. Seqüenciamento dos foscímicos

Selecionados os foscímicos para seqüenciamento, foi realizada uma tentativa de minimizar o trabalho e acelerar as etapas de elaboração de uma sub-biblioteca. Com o DNA de dois foscímicos (03F09 e 04H05) foi construída uma sub-biblioteca no vetor pUC19 enquanto que, as 8 sub-bibliotecas dos foscímicos 08C01, 10C07, 02A07, 03A02, 05E08, 15G08, 04G11 e 06G11 foram realizadas utilizando vetor pUC18/BamHI.

Após o seqüenciamento de aproximadamente 1536 clones da sub-biblioteca 03F09/04H05, as análises de bioinformática pelo pacote phredPhrap/Consed mostraram que os respectivos foscímicos não estavam totalmente seqüenciados, uma vez que era esperado um consenso em torno de 30-35 kb cada em relação ao tamanho dos foscímicos obtidos por eletroforese de campo pulsado (Figura4). O tamanho dos insertos seqüenciados nesta sub-biblioteca variaram em torno de 500 – 1000 pb, sendo que o esperado era em torno de 1000 – 3000 pb, além de disso foi observado um baixo índice de eficiência de ligação (~45%), apresentando assim uma alta porcentagem de vetor pUC19 nesta sub-biblioteca. Por outro lado, o seqüenciamento completo das outras sub-bibliotecas, 08C01 e 10C07, por exemplo, foi obtido com aproximadamente 576 clones, para cada sub-biblioteca. Estes resultados obtidos com a utilização do vetor pUC18 apresentaram insertos em torno de 1000 a 3000 pb. A explicação para a eficiência de clonagem observada com o pUC18 pode estar no fato de que o pUC19 apresenta extremidades abruptas e o pUC18 extremidade coesiva com a enzima BamHI, assim não é necessário a reação de reparo das extremidades quando esta é necessária para o pUC19.

IV. 7. Análise dos dados de seqüenciamento

A análise filogenética constitui-se em uma ferramenta importante visando comparações genômicas. Seqüências de genomas completos fornecem informações necessárias pra futuras análises funcionais, além de referências para desvendar a função e evolução de genes e genomas, através da comparação de seus componentes e organização estrutural entre diferentes espécies.

Dados preliminares de eletroforese de campo pulsado com DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, no LBMP, mostram que seu genoma varia entre 7 a 8 Mb (KISHI et al., 2005), enquanto o de *B. japonicum* apresenta tamanho igual a 8,5 Mb. Estes resultados prévios foram importantes porque corroboram a escolha de *B. japonicum* como base para sua primeira compração genômica e serviu como guia para categorização das seqüências de *B. elkanii*.

Após o seqüenciamento dos clones plasmidiais e dos fosmídeos, estes foram inseridos na montagem do genoma BE587, onde até o dia 19 de novembro de 2007 haviam sido depositados 55439 seqüências, sendo que dstas 36,258 seqüências apresentavam qualidade phred maior ou igual 20. A montagem congelada gerou 3941 Contigs (Tabela 6) com uma cobertura genômica em torno de 64% (<http://lbmp.fcav.unesp.br/be587/reportShotgun.htm>), esse número de genes quando comparado aos 8317 genes de *B. japonicum* (KANEKO et al., 2002), correspondem a uma média de 64% de genes identificados em *B. elkanii*, em relação ao tamanho esperado de 8 Mb do genoma de *B. elkanii* (Kishi et al, 2005). Assim o genoma parcial de BE587 foi submetido à análises por bioinformática para realizar os processos de identificação de ORFs e anotação das mesmas.

Os fastas dos Contigs foram comparado com o GenBank através do programa BLAST, filtrando o resultado e armazenando em banco de dados no servidor LBMP. Módulos de anotação foram utilizados para identificar ORFs nos consensos dos Contigs e depositados no servidor LBMP.

Tabela 6: Relação com dados gerais gerados pelo projeto genoma parcial de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587.

<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA587				
	número	nucleotídeos seqüenciados	% GC	cobertura do genoma
Contigs	3941	5.821.111	62,6	/
Singlets	3825			/
Total	/			64%
seqüências				
forward e reverse	55.439	/	/	/
ORFs	5381	/	/	/
tRNA	31	/	/	/
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110				
tamanho do				
genoma	/	9105828	64,1	100%
ORFs	8317	/	/	/
tRNA	44	/	/	/
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> X <i>Bradyrhizobium japonicum</i>				
	ORFs comuns	4052		
	ORFs exclusivas BE	693		

Um total de 5381 ORFs foram identificadas através dos “scripts” para o módulo de anotação, onde foram anotadas automaticamente 4745 ORFs utilizando “scripts” para filtrar os resultados de comparação com os bancos de dados do GenBank e Rhizobase. Todas ORFs anotadas foram categorizadas seguindo o padrão do banco Rhizobase (figura 5). Uma representação de todas as 4745 ORFs anotadas e comparadas com *B. japonicum* pode ser visualizado em <http://lbmp.fcav.unesp.br/be587/mapa>.

Todas as ORFs foram identificadas em categorias, sendo que a categoria de genes hipotéticos foi a que mais se destacou (Figura 5). Esta categoria engloba genes que não apresentaram similaridade com nenhum gene de função conhecida. Este resultado é importante por refletir a possível identificação de genes novos, o que vem

corroborar a necessidade de continuidade do sequenciamento de DNA genômico de *B. elkanii*.

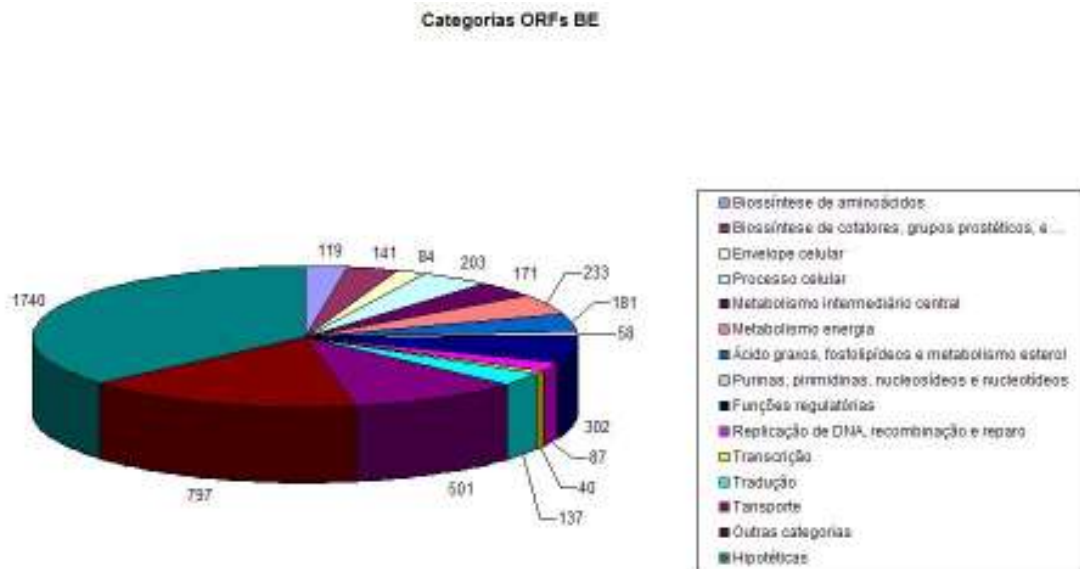


Figura 5: Gráfico representando as categorias das ORFs de BE587 seguindo as normas do banco Rhizobase.

IV. 8. Comparação filogenética

O grau de similaridade existente entre *B. elkanii* a partir das seqüências neste trabalho e *B. japonicum* foi analisado pela comparação filogenética de diferentes genes. A similaridade avaliada pelo gene 16S rDNA de *B. elkanii* com os 16S rDNA de diferentes rizóbios que constam do banco de dados Rhizobase mostrou 97% de similaridade com o *B. japonicum*, o bradirrizóbio utilizado nos estudos comparativos deste trabalho (Figura 6A). Quando a análise comparativa é realizada utilizando diferentes seqüências de genes *fixA* (Figura 6B) e *nifA* (Figura 6C) relacionados a fixação do nitrogênio esta similaridade com o *B. japonicum* fica em torno de 91%, 94 % para *nifH* (Figura 6D) e 90% para *nodZ* (Figura 6E)

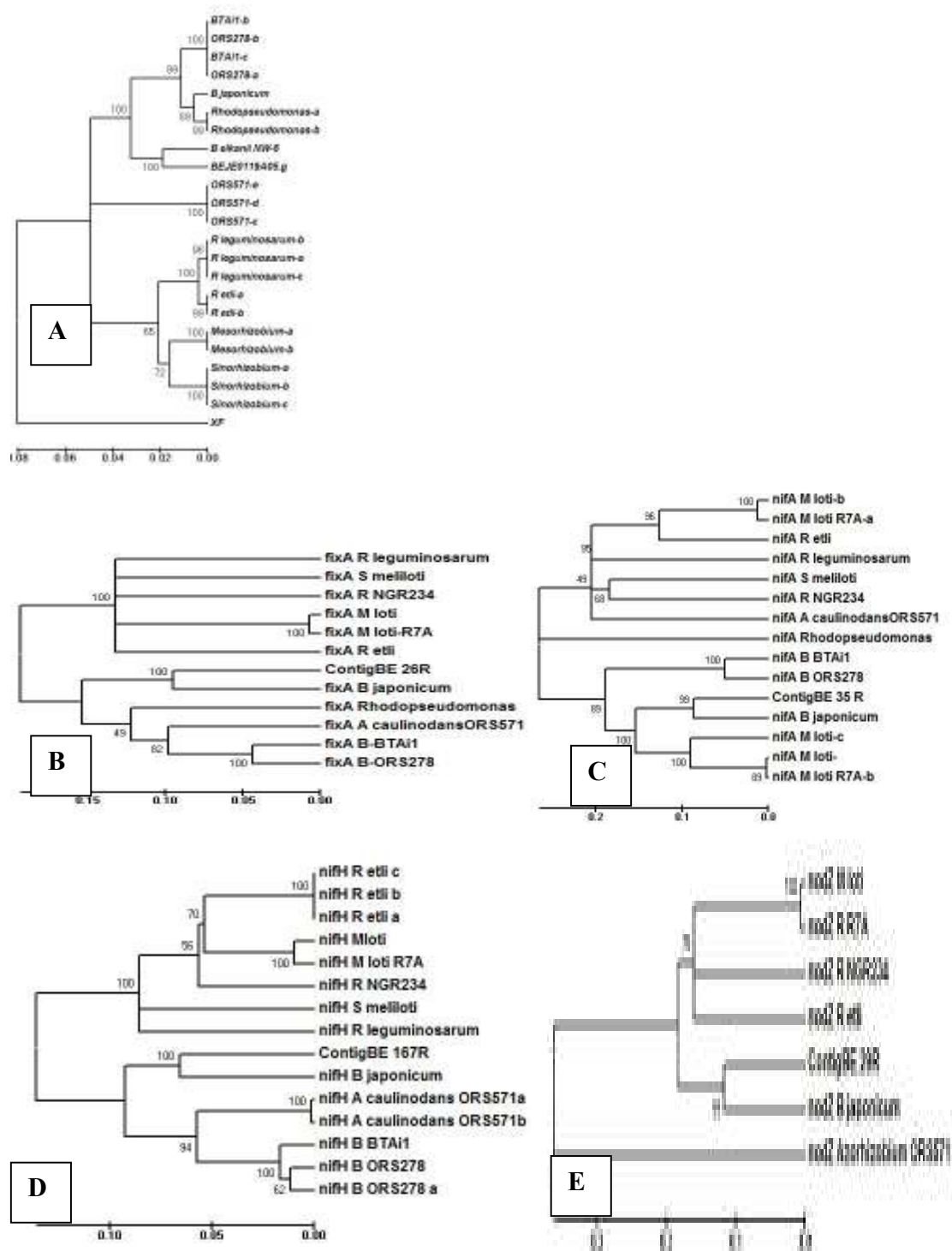


Figura 6: Relacionamento filogenético entre diferentes rizóbios em diferentes genes. A: 16S rDNA; B: *fixA*; C: *nifA*; D: *nifH* e E: *nodZ*. Os números internos representam o valor de bootstrap. XF: *Xylella fastidiosa*; *Mesorhizobium loti* (MAFF303099); *Bradyrhizobium*

japonicum (USDA110); *Sinorhizobium meliloti* (1021); *Rhizobium etli* (CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (biovar *viciae* 3841); *Rhizobium* sp. (pNGR234ab); *Mesorhizobium loti* R7A; *Bradyrhizobium* sp BTAi1; *Bradyrhizobium* sp ORS278; *Azorhizobium caulinodans* ORS571; *Rhodopseudomonas palustris* CGA0009.

Estes índices diferentes de similaridade entre dois organismos avaliados por seqüências gênicas mostram como a análise de um gene pode influenciar a interpretação da relação filogenética, uma vez que genes mais conservados apresentam menos variações entre os organismos estudados. Esse viés conservador ocorre em todos os organismos de maneira equivalente e, portanto, não irá influenciar em uma análise filogenética para um lado ou outro (RUSSO, 2001). Estas observações indicam que rizóbios diferem significativamente quanto ao conteúdo e organização gênicas, independente de suas relações taxonômicas e hábitos simbióticos (GALIBERT *et al.*, 2001).

IV. 9. Genes da Ilha simbiótica

Uma ilha ou região simbiótica corresponde a um agrupamento de genes simbióticos que se integraram no genoma após transferência horizontal de genes a partir de linhagens diferentes. Regiões simbióticas são primariamente passíveis da ocorrência de rearranjos de DNA. Contudo, evolutivamente, na ausência de rearranjos genômicos, esta região acabou por conter a maior quantidade de genes envolvidos na simbiose em diferentes rizóbios (GÖTTFERT *et al.*, 2001; KANEKO *et al.*, 2000).

A ilha simbiótica em rizóbio foi primeiramente identificada em *M. loti* ICMP3153, como um segmento de DNA transmissível de aproximadamente 500 Kb em comprimento, inserido dentro de um gene *phe-tRNA*. A maioria dos genes para nodulação e fixação do nitrogênio foram localizados dentro da ilha simbiótica cromossomal, embora o genoma de *M. loti* seja tripartido (cromossomo, pMLa e pMLb) (KANEKO *et al.*, 2000). Já em *S. meliloti*, outro rizóbio que apresenta genoma tripartido, a maioria dos genes para nodulação e fixação do nitrogênio foram encontrados no megaplasmídeo pSymA, embora os três elementos genômicos (cromossomo, pSymA e pSymB) contribuam em graus variados para a simbiose (GALIBERT *et al.*, 2001).

Por outro lado, em *B. japonicum*, uma ilha simbiótica de 680 Kb identificada no cromossoma, após o seqüenciamento do genoma total de *B. japonicum* inclui uma porção de 410 Kb de um segmento de DNA contendo o conjunto de genes para a nodulação e fixação simbiótica do nitrogênio da ilha previamente descrita por Göttfert e colaboradores (2001). A ampliação no tamanho desta região simbiótica para *B. japonicum* baseou-se no conteúdo GC mais baixo (59,4%), comparado a outras porções do cromossomo. Adicionalmente, esta região expandida englobou outros genes previamente não encontrados na região de 410Kb, como o gene *nodM* (KANEKO et al., 2002).

A ilha simbiótica de *B. japonicum* contém 645 genes codificadores de proteínas, dos quais 301 tiveram suas funções deduzidas por similaridade com genes de função conhecida, incluindo aqueles relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio. Esta ilha simbiótica está restrita às coordenadas 1.8678.486-2.289.058 no mapa de *B. japonicum* (KANEKO et al., 2002).

As tabelas 8 e 9 mostram apenas os genes *nod*, *nol*, *noe*, *nif* e *fix* comuns aos genomas de *B. japonicum* e *B. elkanii*. Embora o genoma deste último ainda não tenha sido completamente seqüenciado, tentativamente os 267 (88%) possíveis genes que codificam proteínas foram colocados em uma provável ilha simbiótica de *B. elkanii* (figura7), (<http://lbmp.fcav.unesp.br/be587/mapa>). Este incluem os genes *nifDKENX* (BE1685, BE797, BE2242, BE2169 e BE2241, BE2168 genes respectivamente), *nifS* (BE192 e BE5377); *nifB* (BE166); *nifH* (BE167, BE191, BE1452 e BE5375). *fixBCX*, 3 cópias para *fixB* (BE168, BE193 e BE5378), 3 cópias para *fixC* (BE169, BE194 e BE5379), 3 cópias para *fixX* (BE155, BE181 e BE5364) que estão em arranjo similar ao da ilha de *B. japonicum*. Em *B. japonicum* um “cluster” coordenado à este é composto pelos genes *nolZY-nolA-nodD2-nodD1YABCSUIJ-nolMNO-nodZ-fixR-nifA-fixA*. Em *B. elkanii* ainda não foi possível localizar todos os genes, mas existe forte evidência de que um mesmo tipo de “cluster” exista uma vez que os genes *nolY* (BE4219), *nolA* (BE4651), *nodC* (BE2287), *nolO* (BE22), *nodZ* (BE29), *fixR* (BE27), *nifA* (BE35), *fixA* (BE26) foram aí encontrados.

Por outro lado, esta ilha simbiótica de *B. elkanii* não deve ser totalmente similar à de *B. japonicum*. Isto pode ser inferido pelo fato de os genes *trbLFGI*, envolvidos na transferência conjugal de proteínas que em *B. japonicum* encontram-se dentro da IS nas coordenadas 1,773,989-1,794,230 em *B. elkanii* esta cópia não foi encontrada na IS, até o momento. Entretanto outra região do mapa de *B. japonicum* um operon contendo os genes *trbIGFLJECBD* nas ordenadas 9069292-9075942 é coincidente ao operon *trbIGFLJECDB* (BE740, BE1444, BEBE1443, BE322, BE880, BE337, BE2361, BE1060 e BE1061) de *B. elkanii*.

Outra característica importante consiste nos genes para possíveis transposases. De um total de 101 genes para possíveis transposases localizado em *B. elkanii*, apenas 17 foram encontradas na ilha simbiótica, contrastando com os 167 que foram encontradas em *B. japonicum* onde apenas 63 genes se encontram na ilha simbiótica. As características estruturais e funcionais distintivas entre as ilhas simbióticas de *B. japonicum* e *B. elkanii* podem ser interpretadas como consequência de sua emergência evolutiva. Adicionalmente, em *B. elkanii*, um número de genes parece ser duplicado, incluindo vários genes simbióticos (Tabela 7).

Na figura abaixo (Figura 7) comparamos as duas ilha simbiótica. Todas as categorias dos genes observados na IS de *B. japonicum* também o foram na de *B. elkanii*. Embora este último tenha um seqüenciamento ainda parcial algumas semelhanças e diferenças podem ser observadas. Assim, na categoria biossíntese de aminoácidos e biossíntese de cofatores, 5 genes foram encontrados em *B. elkanii* contra os 6 de *B. japonicum*. Uma análise visual desta figura mostra as diferenças entre as diversas categorias, entretanto, um destaque deve ser dado à “Outras categorias” na qual estão incluídos os genes relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio (Tabela 8 e 9) que estão presentes em *B. elkanii* em maior número (115) do que em *B. japonicum* (87). A análise cuidadosa destes genes relacionados á FBN mostrada na tabela 7 revela que muitos genes têm número de cópias diferentes nas duas ilhas analisadas. Se isto tem haver com o fato de o *B. elkanii* ser mais competitivo e eficiente na fixação do nitrogênio é uma hipótese que vem sendo pesquisada no LBMP com o auxílio de técnicas de expressão gênica como os microarranjos de DNA e PCR em tempo real.

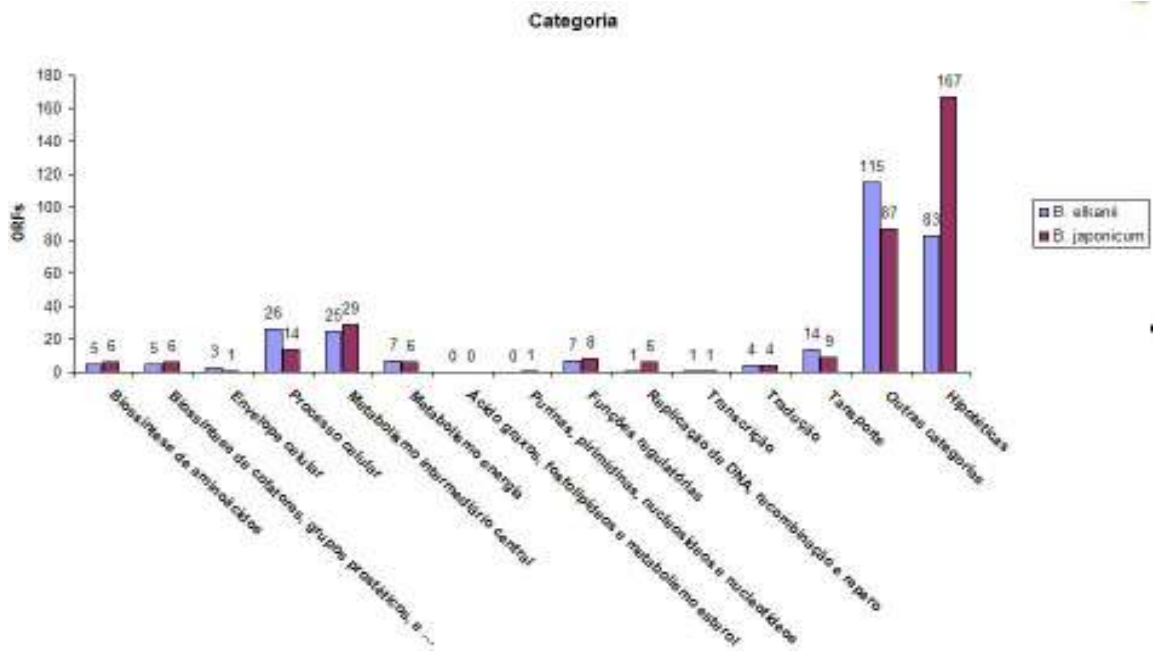


Figura 7: Gráfico representando o número de genes observados nas categorias funcionais da região da Ilha Simbiótica de *B. elkanii* e das ORFs de *B. japonicum*.

Tabela 7: Genes relacionados com nodulação e fixação de nitrogênio entre *B. japonicum* e *B. elkanii*, * indica o número de genes encontrados.

gene	produto	BJ	BE
nodA	Aciltransferase	*	*
nodB	De-N-acetilase	*	
nodC	Quitina sintase	*	
nodD	Ativador transcricional da família LysR	*	*
nodE	Beta-cetoacil sintase		
nodF	Proteína Acil carreadora		
nodG	Beta-cetoacil redutase		*
nodH	Sulfotransferase		
nodI	Transporte de fatores Nod	*	*
nodI	Transporte de fatores Nod	*	
nodJ	Proteína de secreção de polissacarídeo capsular	*	
nodK	Desconhecida/Similar a nodY		
nodL	O-Acetiltransferase		
nodM	D-glicosamina sintase	*	*
nodM	D-glicosamina sintase	*	*
nodN	Desconhecida/Síntese de fator Nod	*	
nodO	Hemolisina/Proteína formadora de poro		
nodP	ATP-sulfurilase/APS-quinase		

nodQ	ATP-sulfurilase/APS-quinase	*	**
nodR	Desconhecida		
nodS	Metiltransferase	*	
nodT	Proteína de membrana/Transporte de fatores Nod?		
nodU	O-Carbamoiltransferase	*	**
nodV	Sensor, família regulatória de dois componentes	*	***
nodW	Regulador, família regulatória de dois componentes	*	****
nodX	Exopolissacarídeo ácido codificado por exoZ		
nodY	Desconhecida	*	*
nodZ	Fucosiltransferase	*	**
noIA	Regulador positivo da família MerR	*	*
noIB	Sistema de secreção?	*	*
noIC	Nodulação		
noID	Regulador?		
noIE	Proteína periplasmática		
noIF	Transporte		
noIG	Transporte		
noIH	Transporte		
noII	Transporte		
noIJ	Desconhecida		
noIK	Epimerase/Desidrogenase?	*	*
noIL	O-Acetiltransferase		
noIM	Atuação com nodZ	*	
noIN	Desconhecida	*	
noIO	O-Carbamoiltransferase	*	****
noIP	Desconhecida		
noIQ	O-Carbamoiltransferase		
noIR	Repressor de genes nod		
noIS	Desconhecida		
noIT	Sistema de secreção?		
noIU	Sistema de secreção?	*	*
noIV	Sistema de secreção?	*	*
noIW	Sistema de secreção?		
noIX	Sistema de secreção?	*	*
noIY	Desconhecida	*	
noIZ	Nodulação normal		
noeA	Metil-transferase?		
noeB	Desconhecida		
noeC	Arabinosilação		
noeD	Desconhecida	*	
noeE	Sulfatação de fucose	*	
noeE	Sulfatação de fucose	*	
noeF	Desconhecida		
noel	O-Metiltransferase	*	*
noeJ	Guanililtransferase		
noeL	Desidratase	*	**
noeK	Fosfomanomutase		

nifA	Regulador positivos dos genes nif, fix e outros	*	*
nifB	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator	*	*
nifD	Subunidade alfa da MoFe-proteína da nitrogenase	*	*
nifE	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator	*	*
nifH	Fe-proteína da nitrogenase	*	* * *
nifK	Subunidade beta da MoFe-proteína da nitrogenase	*	*
nifN	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator	*	* *
nifQ	Processamento de molibdênio	*	* * *
nifS	Cisteína desulfurase	*	* *
nifS	Cisteína desulfurase	*	*
nifS	Cisteína desulfurase	*	* * *
nifU	Desconhecida		
nifV	Homocitrato sintase		
	Desconhecida; requerido para completa atividade da		
nifW	Fe-Mo-proteína	*	* * *
nifX	Desconhecida	*	*
nifZ	Envolvido a biossíntese do FeS-cofator	*	* * * *
fixA	Requerido para atividade nitrogenase;	*	* *
fixB	Requerido para atividade nitrogenase;	*	* * *
fixC	Requerido para atividade nitrogenase;	*	* * *
	Requerido para atividade nitrogenase; similiaridade		
fixX	com ferredoxinas	*	* * *
	Induzido microaerobicamente; citocromo oxidase		
fixN	ligada a membrana	*	* * *
	Induzido microaerobicamente; citocromo oxidase		
fixO	ligada a membrana	*	
	Induzido microaerobicamente; citocromo oxidase		
fixQ	ligada a membrana	*	
	Induzido microaerobicamente; citocromo oxidase		
fixP	ligada a membrana	*	*
fixG	Processo redox acoplado a bomba de cátion	*	
fixH	Processo redox acoplado a bomba de cátion		
fixI	Processo redox acoplado a bomba de cátion	*	* * *
fixS	Processo redox acoplado a bomba de cátion	*	
	Sistema regulatório de dois componentes sensível ao		
fixL	oxigênio	*	* * *
	Sistema regulatório de dois componentes sensível ao		
fixJ	oxigênio	*	* * *
fixK	Regulador transcricional		
fixK2	Regulador transcricional	*	* * *
Rm			
fixK'	Cópia funcional de fixK		
Bj			
fixK1	Homólogo fiK de função desconhecida		
	Desconhecida e não essencial para fixação do		
fixR	nitrogênio	*	*
fixR	Desconhecida e não essencial para fixação do	*	* *

	nitrogênio
ngrA	Regulação de nifA
fixT	Regulador transcricional
fixU	Desconhedica

IV. 10. Genes relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio

Genes relacionados a vários passos na fixação simbiótica do nitrogênio foram identificados no genoma de *B. elkanii*, listados em categorias de acordo com o Rhizobase. A ausência de genes ainda não identificados, ou não presentes, na ilha simbiótica, foi muito maior para os genes relacionados à nodulação do que aqueles envolvidos na fixação do nitrogênio. Alguns dos genes localizados na ilha simbiótica em *B. japonicum* encontram-se aparentemente fora de uma possível ilha em *B. elkanii*. Por exemplo, os genes *nodB* (BE2286) e *nodC* (BE2287), não identificados na suposta região da ilha, foram encontrados numa outra região do genoma de *B. elkanii*.

Os genes relacionados à nodulação codificadores do fator Nod quitooligosacarídico (LCO), básico para nodulação foram encontrados (*nodABC*), assim como um conjunto de genes codificadores de enzimas envolvidas na modificação deste fator. Os genes *nodI* e *nodJ* parecem estar envolvidos na secreção deste fator, embora apenas o primeiro tenha sido encontrado no genoma parcial de *B. elkanii* (BE2572).

Os genes *nodABC* são suficientes para síntese dos pentâmeros N-acetil-D-glicosamina que possuem atividade simbiótica nas plantas. Contudo, genes *nod* adicionais do tipo *hsn* permitem modificações químicas nos fatores Nod e contituem-se no principais determinantes da especificidade ao hospedeiro, além de protegê-los da degradação durante interação com as plantas (PERRET et al., 2000). As principais modificações são: adição de ácidos graxos N-ligados ao terminal não-redutor do açúcar

(*nodEF*); 6-O-glicosilação do tipo arabinosilação (*noeC*) ou fucosilação (*nofZ*, *nolK*); sulfatação (*nodH*, *noeE*); acetilação (*nolL*, *nodX*, *nolL*); N metilação e carbamoilação (*nodS*, *nodU*, *nolO*); e 2-O-metilação (*noeI*). No genoma parcial de *B. elkanii* e presente na suposta ilha simbiótica foram identificados as seguintes possíveis modificações nos fatores Nod: glicosilações, sulfatações, carbomoilações, fucosilações e metilações.

Do cluster contendo os genes *exoP* (succinoglycan biosynthesis transport), *exoZ* (provável exopolysaccharide) e 6 genes similares a glicosil transferase, todos envolvidos na síntese de exopolissacarídeos apenas a *exoP* (BE1375) e uma glicosil transferase (BE408) foi encontrado.

A seqüência para duas ORFs BE4784 e BE5295 apresentou alta similaridade para 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, esta enzima é fortemente envolvida na redução da concentração de etileno durante o processo de formação de nódulos.

Os genes *nolK*, *noeL*, *nodM* e *noeD* formam um cluster na IS em *B. japonicum*, mas até o momento foi encontrado apenas os genes *nolK* (BE3328), *noeL* (BE3222), *nodM* (BE5131) e *nodQ* (BE104).

Das quatro cópias do gene *dnaJ* em *B. japonicum* apenas duas foram encontradas em *B. elkanii* (BE570 e BE1166), envolvidos na regulação de formação de nódulos e fixação de nitrogênio.

Foram encontrados dos genes *fixK2/fixLJ/fixNOPQ/fixGHIS* de *B. japonicum* as ORFs BE3825/BE4225, BE345/BE348, __, BE4350, __/BE1075, __, 596, __ para os respectivos genes, menos para *fixO*, *fixQ*, *fixH* e *fixS*, que estão relacionadas a uma cascata de sensibilidade ao oxigênio e alta afinidade ao terminal oxidativo requeridos para respiração microanaróbica e fixação do nitrogênio nos nódulos.

Embora alguns destes genes não tenham sido ainda identificados, o gene *fixN* codificador da citocromo oxidase simbiótica teve sua expressão analisada tanto in vitro como em simbiose (SOUZA, 2006). Assim, é provável que mais de um dos reguladores baseados na sensibilidade ao oxigênio estejam atuando em *B. elkanii*, neste caso a cascata FiLJ-FixK2 e a cascata RegSR-NifA. A ilha simbiótica BE apresenta os genes *fixLJ* e *nifA*. Os genes *nifHDK* que sintetizam as subunidades do complexo enzimático nitrogenase estão presentes na ilha BE. Os genes *nif* e *fix* são organizados em clusters distintos cujas estrutura e localização genômica são do tipo espécie-específica (FISCHER, 1994).

V. Conclusão

A técnica de PCR usando “*primers*” específicos para um determinado gene usando um conjunto (pool) de DNA é eficiente e agiliza na busca e identificação de um clone que contém a seqüência alvo.

DNA e vetor de boa qualidade e isento de contaminates é de suma importância para a construção de uma biblioteca e sequenciamento.

Devido ao grande número de dados de sequenciamento, a bioinformática é essencial nos processos de análise e organização dos resultados.

O objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar se *B. elkanii* também apresentava uma ilha simbiótica tal qual o *B. japonicum* onde os genes relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio estão localizados. Embora o genoma deste microorganismo ainda não tenha sido totalmente seqüenciado as análises realizadas sugerem a presença de uma ilha simbiótica em *B. elkanii* com semelhanças e diferenças que a tornam única, uma vez que foram identificadas cerca de 80% dos genes relacionados à ilha simbiótica em *B. elkanii*.

Tabela 8: Relação das ORFs de *B. elkanii* SEMIA 587 relacionados as ORFs da Ilha Simbiótica de *B. japonicum*.

ORF	id	produto	categ
BE	197	outer membrane protein	3.1
BE	198	putative peptidase	14.8
BE	200	alkyl hydroperoxide reductase	14.8
BE	201	iron-sulfur cofactor synthesis protein	5.3
BE	202	unknown protein	15.2
BE	208	hypothetical protein	15.1
BE	209	putative glutamine synthetase	1.4
BE	210	hypothetical protein	15.1
BE	211	putative amidotransferase subunit	14.8
BE	212	hypothetical protein	15.1
BE	226	putative transposase	14.6
BE	250	putative transposase	14.6

BE	255	putative transposase	14.6
BE	259	ABC transporter permease protein	13
BE	317	putative transposase	14.6
BE	320	10 KD chaperonin	4.3
BE	327	hypothetical protein	15.1
BE	356	C4-dicarboxylate transport protein	13
BE	366	hypothetical protein	15.1
BE	376	putative transposase	14.6
BE	381	putative transposase	14.6
BE	382	two-component response regulator	9
BE	466	two-component response regulator	9
BE	483	RhcT protein	4.6
BE	484	RhcU protein	4.6
BE	594	10 KD chaperonin (protein CPN10)	4.3
BE	595	60 KDA chaperonin	4.3
BE	698	two component regulator	14.7
BE	768	adenine phosphoribosyltransferase	10
BE	853	unknown protein	15.2
BE	859	unknown protein	15.2
BE	866	outer-membrane immunogenic protein precursor	3.1
BE	889	unknown protein	15.2
BE	892	putative amidotransferase subunit	14.8
BE	919	unknown protein	15.2
BE	920	unknown protein	15.2
BE	939	putative transposase	14.6
BE	1001	VirK protein homolog	9
BE	1033	HupD protein	5.6
BE	1053	6-O-carbamoyl transferase	14.7
BE	1054	transcriptional regulatory protein Fis family	9
BE	1273	putative transposase	14.6
BE	1300	hypothetical protein	15.1
BE	1301	hypothetical protein	15.1
BE	1410	hypothetical protein	15.1
BE	1452	dinitrogenase reductase protein	5.3
BE	1463	putative transposase	14.6
BE	1506	putative sugar hydrolase	6.7
BE	1515	putative carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	5.6
BE	1536	unknown protein	15.2
BE	1553	hypothetical protein	15.1
BE	1630	probable maturase	14.6
BE	1631	putative transposase	14.6
BE	1640	putative transposase	14.6
BE	1685	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	5.3
BE	1704	hypothetical zinc protease	12.3
BE	1711	hypothetical protein	15.1
BE	1732	nodulation protein	14.7
BE	1734	nodulation protein	14.7

BE	1735	RhcN protein	4.6
BE	1788	coproporphyrinogen III dehydrogenase	2.3
BE	1855	putative transposase	14.6
BE	1881	60 KDA chaperonin	4.3
BE	1897	putative transposase	14.6
BE	1937	hypothetical protein	15.1
BE	2021	ABC transporter ATP-binding protein	13
BE	2098	putative transposase	14.6
BE	2134	unknown protein	15.2
BE	2152	alanine dehydrogenase	6.1
BE	2168	iron-molibdenum cofactor processing protein	5.3
BE	2169	nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein	5.3
BE	2176	host-inducible protein A homolog	14.8
BE	2241	nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein	5.3
BE	2242	nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein	5.3
BE	2248	hydrogenase nickel incorporation protein	14.5
BE	2249	HupK protein	5.6
BE	2274	heat shock protein	4.3
BE	2286	nodulation chito-oligosaccharide deacetylase	14.7
BE	2287	chitin synthase	14.7
BE	2298	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	1.2
BE	2389	ABC transporter ATP-binding protein	13
BE	2402	putative transposase	14.6
BE	2413	ABC transporter ATP-binding protein	13
BE	2450	putative transposase	14.6
BE	2482	putative acetyltransferase	14.8
BE	2512	similar to pantoate--beta-alanine ligase	6.1
BE	2515	probable pectinesterase	14.8
BE	2518	transcriptional regulatory protein GntR family	9
BE	2519	8-amino-7-oxononanoate synthase	2.1
BE	2520	biotin synthetase	2.1
BE	2527	uptake hydrogenase large subunit homolog	14.5
BE	2529	HupC protein homolog	5.6
BE	2594	unknown protein	15.2
BE	2596	hypothetical protein	15.1
BE	2597	unknown protein	15.2
BE	2612	hypothetical protein	15.1
BE	2626	unknown protein	15.2
BE	2628	unknown protein	15.2
BE	2632	hypothetical protein	15.1
BE	2641	nodulation protein	14.7
BE	2701	unknown protein	15.2
BE	2702	unknown protein	15.2
BE	2713	citrate-proton symporter	6.8
BE	2759	cytochrome P450 family protein	4.5
BE	2809	putative transposase	14.6
BE	2812	hypothetical zinc protease	12.3

BE	2845	uptake hydrogenase small subunit precursor homolog	14.5
BE	2873	unknown protein	15.2
BE	2874	unknown protein	15.2
BE	2892	putative transposase	14.6
BE	2893	putative transposase	14.6
BE	2896	unknown protein	15.2
BE	2902	heat shock protein	4.3
BE	2903	hypothetical zinc protease	12.3
BE	2924	hypothetical protein	15.1
BE	2927	C4-dicarboxylate transport protein	13
BE	2945	cold shock protein	4.3
BE	2966	putative transposase	14.6
BE	2989	RhcC2 protein	4.6
BE	2993	hypothetical protein	15.1
BE	2994	RhcN protein	4.6
BE	2995	RhcR protein	4.6
BE	2996	RhcQ protein	4.6
BE	3034	uptake hydrogenase small subunit precursor homolog	14.5
BE	3035	uptake hydrogenase precursor	14.5
BE	3036	uptake hydrogenase large subunit homolog	14.5
BE	3067	putative transposase	14.6
BE	3068	putative transposase	14.6
BE	3083	anthranilate phosphoribosyltransferase	1.1
BE	3101	hypothetical protein	15.1
BE	3102	hypothetical protein	15.1
BE	3134	putative transposase	14.6
BE	3143	molybdenum transport system permease protein	13
BE	3202	hypothetical protein	15.1
BE	3223	putative transposase	14.6
BE	3224	putative transposase	14.6
BE	3282	hypothetical protein	15.1
BE	3291	hypothetical protein	15.1
BE	3309	hypothetical protein	15.1
BE	3319	transcriptional regulatory protein LysR family	14.7
BE	3380	unknown protein	15.2
BE	3381	unknown protein	15.2
BE	3478	two component regulator	14.7
BE	3485	putative DNA-binding protein	14.8
BE	3531	heat shock protein	4.3
BE	3532	heat shock protein	4.3
BE	3583	hypothetical protein	15.1
BE	3644	hypothetical protein	15.1
BE	3645	RhcV protein	4.6
BE	3668	hypothetical protein	15.1
BE	3711	probable cation-transporting ATPase (EC 3.6.3.-)	13
BE	3744	heat shock protein	4.3
BE	3745	heat shock protein	4.3

BE	3853	putative transposase	14.6
BE	3877	putative glycosyl hydrolase	6.7
BE	3900	putative transposase	14.6
BE	3922	transcriptional regulatory protein Crp family	9
BE	3945	ferredoxin	6.9
BE	3947	C4-dicarboxylate transport protein	13
BE	3949	ABC transporter permease protein	13
BE	3978	putative transposase	14.6
BE	4023	hypothetical protein	15.1
BE	4025	hypothetical protein	15.1
BE	4058	putative transposase	14.6
BE	4070	putative transposase	14.6
BE	4072	putative transposase	14.6
BE	4078	hypothetical protein	15.1
BE	4091	citrate-proton symporter	6.8
BE	4135	hypothetical protein	15.1
BE	4148	hypothetical protein	15.1
BE	4149	unknown protein	15.2
BE	4159	putative transposase	14.6
BE	4219	NolY protein	14.7
BE	4274	carbonic anhydrase	5.6
BE	4275	hypothetical protein	15.1
BE	4361	putative transposase	14.6
BE	4390	nodulation protein	14.7
BE	4391	RhcC1 protein	4.6
BE	4392	RhcJ protein	4.6
BE	4394	hydrogenase maturation protein	14.5
BE	4404	ABC transporter substrate-binding protein	13
BE	4483	putative transposase	14.6
BE	4513	NodY protein	14.7
BE	4514	transcriptional regulatory protein LysR family	14.7
BE	4515	nodulation chito-oligosaccharide deacetylase	14.7
BE	4516	acyl transferase	14.7
BE	4526	putative transposase	14.6
BE	4528	putative transposase	14.6
BE	4542	putative transposase	14.6
BE	4556	10 KD chaperonin	4.3
BE	4558	60 KDA chaperonin	4.3
BE	4623	unknown protein	15.2
BE	4651	transcriptional regulatory protein MerR family	14.7
BE	4652	ABC transporter substrate-binding protein	13
BE	4664	probable maturase	14.6
BE	4665	unknown protein	15.2
BE	4666	unknown protein	15.2
BE	4667	unknown protein	15.2
BE	4691	putative transposase	14.6
BE	4762	probable polygalacturonase	14.8

BE	4777	hypothetical protein	15.1
BE	4778	8-amino-7-oxononanoate synthase	2.1
BE	4793	hypothetical protein	15.1
BE	4794	hypothetical protein	15.1
BE	4805	putative transposase	14.6
BE	4828	RNA polymerase sigma-54 subunit	11.2
BE	4878	hypothetical protein	15.1
BE	4879	hypothetical protein	15.1
BE	4880	unknown protein	15.2
BE	4881	hypothetical protein	15.1
BE	4883	unknown protein	15.2
BE	4884	hypothetical protein	15.1
BE	4885	RhcV protein	4.6
BE	4891	hypothetical protein	15.1
BE	4927	NolO protein	14.7
BE	4928	oxidoreductase	5.3
BE	4929	NolO protein	14.7
BE	4930	NodZ protein	14.7
BE	4952	unknown protein	15.2
BE	4962	unknown protein	15.2
BE	4963	hypothetical protein	15.1
BE	4999	putative transposase	14.6
BE	5028	putative transposase	14.6
BE	5029	putative transposase	14.6
BE	5062	unknown protein	15.2
BE	5063	hypothetical protein	15.1
BE	5064	hypothetical protein	15.1
BE	5065	hypothetical protein	15.1
BE	5072	probable ATP-binding protein	13
BE	5086	unknown protein	15.2
BE	5088	hypothetical protein	15.1
BE	5089	putative transposase	14.6
BE	5091	putative transposase	14.6
BE	5092	putative transposase	14.6
BE	5098	putative transposase	14.6
BE	5108	putative transposase	14.6
BE	5109	putative transposase	14.6
BE	5110	putative transposase	14.6
BE	5113	putative transposase	14.6
BE	5118	chaperonin GroEL	4.3
BE	5129	two-component response regulator	9
BE	5130	two component regulator	14.7
BE	5132	two component regulator	14.7
BE	5149	putative transposase	14.6
BE	5150	putative transposase	14.6
BE	5162	putative transposase	14.6
BE	5171	putative transposase	14.6

BE	5214	unknown protein	15.2
BE	5217	putative transposase	14.6
BE	5223	putative transposase	14.6
BE	5244	putative transposase	14.6
BE	5245	putative transposase	14.6
BE	5250	putative transposase	14.6
BE	5252	putative transposase	14.6
BE	5254	putative transposase	14.6
BE	5256	putative transposase	14.6
BE	5257	putative transposase	14.6
BE	5260	putative transposase	14.6
BE	5261	putative transposase	14.6
BE	5268	rtxA homolog	14.8
BE	5269	putative amidotransferase subunit	14.8
BE	5270	rtxA homolog	14.8
BE	5271	hypothetical protein	15.1
BE	5272	putative transposase	14.6
BE	5273	rtxA homolog	14.8
BE	5274	putative dihydrorhizobitoxine desaturase	14.8
BE	5275	hypothetical protein	15.1
BE	5276	putative glutamine synthetase	1.4
BE	5337	putative transposase	14.6
BE	5346	probable peptide synthetase	12.5
BE	5349	putative transposase	14.6
BE	5351	putative transposase	14.6
BE	5354	unknown protein	15.2
BE	5356	unknown protein	15.2
BE	5358	unknown protein	15.2
BE	5359	ferredoxin-like protein	5.3
BE	5360	nitrogen fixation protein	5.3
BE	5362	nitrogenase stabilizing/protective protein	5.3
BE	5363	iron-sulfur cofactor synthesis protein	5.3
BE	5364	probable ferredoxin	5.3
BE	5366	ferredoxin	5.4
BE	5367	hypothetical protein	15.1
BE	5369	alkyl hydroperoxide reductase	14.8
BE	5370	hypothetical protein	15.1
BE	5371	molybdenum processing protein	5.3
BE	5372	outer membrane protein	3.1
BE	5373	alkyl hydroperoxide reductase	14.8
BE	5375	dinitrogenase reductase protein	5.3
BE	5376	hypothetical protein	15.1
BE	5377	nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein	5.3
BE	5378	electron transfer flavoprotein alpha chain	5.3
BE	5379	flavoprotein	5.3
BE	5380	FeMo cofactor biosynthesis protein	5.3
BE	5381	putative peptidase	14.8

Tabela 9: Relação das ORFs da Ilha Simbiótica de *B.japonicum*.

ORF	id	produto	categ
BJ_ilha	5382	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5383	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5384	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5385	RhcS protein	4.6
BJ_ilha	5386	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5387	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5388	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5389	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5390	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5391	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5392	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5393	ABC transporter permease protein	13
BJ_ilha	5394	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5395	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5396	NolM protein	14.7
BJ_ilha	5397	putative amidotransferase subunit	14.8
BJ_ilha	5398	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5399	putative pyridoxine kinase (EC 2.7.1.35)	2.1
BJ_ilha	5400	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5401	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5403	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5404	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5405	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5406	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5407	NolZ protein	14.7
BJ_ilha	5408	HupD protein homolog	5.6
BJ_ilha	5409	HupK protein	5.6
BJ_ilha	5410	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5411	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5412	ferredoxin	6.9
BJ_ilha	5413	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5414	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5415	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5416	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5417	probable transcriptional regulator	9
BJ_ilha	5418	RhcR protein	4.6
BJ_ilha	5419	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5420	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5421	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5422	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5423	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5424	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5425	ferredoxin-like protein	5.3
BJ_ilha	5426	putative transposase	14.6

BJ_ilha	5427	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5428	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5429	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5430	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5431	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5432	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5433	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5434	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5435	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5436	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5437	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5438	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5439	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5440	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5441	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5442	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5443	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5444	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5445	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5446	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5447	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5448	two-component response regulator	9
BJ_ilha	5449	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5450	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5451	HupF protein homolog	5.6
BJ_ilha	5452	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5453	nitrogenase stabilizing/protective protein	5.3
BJ_ilha	5454	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5455	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5456	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5457	hydrogenase nickel incorporation protein	14.5
BJ_ilha	5458	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5459	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5460	HupC protein homolog	5.6
BJ_ilha	5461	GroES3 chaperonin	4.3
BJ_ilha	5462	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5463	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5464	ferredoxin	5.4
BJ_ilha	5465	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5466	putative bacA	14.7
BJ_ilha	5467	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5468	probable ferredoxin	5.3
BJ_ilha	5469	R. etli iscN homolog	5.3
BJ_ilha	5470	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5471	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5472	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5473	unknown protein	15.2

BJ_ilha	5474	NoeE homolog	14.7
BJ_ilha	5475	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5476	aspartate 1-decarboxylase precursor	1.2
BJ_ilha	5477	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5478	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5479	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5480	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5481	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5482	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5483	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5484	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5485	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5486	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5487	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5488	putative cold shock protein	4.3
BJ_ilha	5489	ferredoxin	5.4
BJ_ilha	5490	VirK protein homolog	9
BJ_ilha	5491	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5492	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5493	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5494	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5495	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5496	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5497	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5498	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5499	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5500	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5501	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5502	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5503	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5504	HupD protein homolog	5.6
BJ_ilha	5505	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5506	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5507	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5508	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5509	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5510	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5511	nodulation protein	14.7
BJ_ilha	5512	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5513	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5514	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5515	L-ectoine synthase	14.8
BJ_ilha	5516	two component regulator	14.7
BJ_ilha	5517	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5518	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5519	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5520	hypothetical protein	15.1

BJ_ilha	5521	HupK protein homolog	5.6
BJ_ilha	5522	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5523	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5524	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5525	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5526	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5527	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5528	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5529	ABC transporter ATP-binding protein	13
BJ_ilha	5530	alkyl hydroperoxide reductase	14.8
BJ_ilha	5531	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5532	carbonic anhydrase	5.6
BJ_ilha	5533	exonuclease subunit SbcD homolog	10
BJ_ilha	5534	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5535	putative acetyltransferase	14.8
BJ_ilha	5536	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5537	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5539	molybdenum transport system permease protein	13
BJ_ilha	5540	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5541	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5542	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5543	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5544	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5545	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5546	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5548	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5549	iron-sulfur cofactor synthesis protein	5.3
BJ_ilha	5550	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5551	N-methyl transferase	14.7
BJ_ilha	5552	NodY protein	14.7
BJ_ilha	5553	HupH protein homolog	5.6
BJ_ilha	5554	transcriptional regulatory protein MerR family	14.7
BJ_ilha	5555	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5556	transcriptional regulatory protein GntR family	9
BJ_ilha	5557	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5558	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5559	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5560	NoeE homolog	14.7
BJ_ilha	5562	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5563	similar to protease	12.3
BJ_ilha	5564	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5565	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5566	outer membrane protein	3.1
BJ_ilha	5567	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5568	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5569	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5570	nodulation protein	14.7

BJ_ilha	5571	transcriptional regulatory protein Crp family	9
BJ_ilha	5572	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5573	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5574	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5575	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5577	nodulation protein	14.7
BJ_ilha	5578	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5579	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5580	two-component response regulator	9
BJ_ilha	5581	nodulation chito-oligosaccharide deacetylase	14.7
BJ_ilha	5582	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5583	similar to zinc protease	12.3
BJ_ilha	5584	RhcC1 protein	4.6
BJ_ilha	5585	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5586	NolY protein	14.7
BJ_ilha	5587	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5588	RhcJ protein	4.6
BJ_ilha	5589	rtxA homolog	14.8
BJ_ilha	5590	RhcT protein	4.6
BJ_ilha	5591	transcriptional regulatory protein LuxR family	9
BJ_ilha	5592	NodJ protein	14.7
BJ_ilha	5593	exonuclease subunit SbcD homolog	10
BJ_ilha	5594	probable phosphotransferase	14.8
BJ_ilha	5595	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5596	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5598	host-inducible protein A homolog	14.8
BJ_ilha	5599	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5600	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5601	electron transfer flavoprotein beta chain	5.3
BJ_ilha	5602	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5603	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5604	putative sugar hydrolase	6.7
BJ_ilha	5605	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5606	ABC transporter permease protein	13
BJ_ilha	5607	similar to zinc protease	12.3
BJ_ilha	5608	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5609	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5610	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5611	molybdenum processing protein	5.3
BJ_ilha	5612	dinitrogenase reductase protein	5.3
BJ_ilha	5613	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5614	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5615	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5616	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5617	oxidoreductase	5.3
BJ_ilha	5618	similar to inosamine-phosphate amidinotransferase	14.8
BJ_ilha	5619	transcriptional regulatory protein LysR family	14.7

BJ_ilha	5620	pantoate--beta-alanine ligase	6.1
BJ_ilha	5621	nodulate formation efficiency C protein	14.7
BJ_ilha	5622	transporter of Nod factors	14.7
BJ_ilha	5623	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5624	similar to pantoate--beta-alanine ligase	6.1
BJ_ilha	5625	ribokinase	8.1
BJ_ilha	5626	exonuclease subunit SbcC homolog	10
BJ_ilha	5627	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5629	RhcU protein	4.6
BJ_ilha	5630	hydrogenase expression/formation protein	14.5
BJ_ilha	5631	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5632	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5633	anthranilate phosphoribosyltransferase	1.1
BJ_ilha	5634	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5635	transcriptional regulatory protein LysR family	14.7
BJ_ilha	5636	biotin synthetase	2.1
BJ_ilha	5637	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5638	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5639	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5640	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5641	alanine dehydrogenase	6.1
BJ_ilha	5642	RhcQ protein	4.6
BJ_ilha	5643	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5645	electron transfer flavoprotein alpha chain	5.3
BJ_ilha	5646	probable pectinesterase	14.8
BJ_ilha	5648	8-amino-7-oxononanoate synthase	2.1
BJ_ilha	5649	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5650	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5651	putative dihydrorhizobitoxine desaturase	14.8
BJ_ilha	5652	nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein	5.3
BJ_ilha	5653	phenolhydroxylase homolog	14.8
BJ_ilha	5654	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5655	NodZ protein	14.7
BJ_ilha	5656	flavoprotein	5.3
BJ_ilha	5657	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5658	RhcC2 protein	4.6
BJ_ilha	5659	C4-dicarboxylate transport protein	13
BJ_ilha	5660	citrate-proton symporter	6.8
BJ_ilha	5661	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5662	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5663	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5664	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5666	cytochrome P450 family protein	4.5
BJ_ilha	5667	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5668	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5669	coproporphyrinogen III dehydrogenase	2.3
BJ_ilha	5670	rtxA homolog	14.8

BJ_ilha	5671	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5672	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5673	chitin synthase	14.7
BJ_ilha	5674	RhcN protein	4.6
BJ_ilha	5675	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5676	probable maturase	14.6
BJ_ilha	5677	HipA protein	5.6
BJ_ilha	5678	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5679	para-aminobenzoate synthase component I	1.1
BJ_ilha	5681	GroEL3 chaperonin	4.3
BJ_ilha	5682	putative glutamine synthetase	1.4
BJ_ilha	5683	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5684	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5685	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5687	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5688	ABC transporter substrate-binding protein	13
BJ_ilha	5689	RNA polymerase sigma-54 subunit	11.2
BJ_ilha	5690	probable polygalacturonase	14.8
BJ_ilha	5691	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5692	FeMo cofactor biosynthesis protein	5.3
BJ_ilha	5693	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5694	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5695	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	5.3
BJ_ilha	5696	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	5.3
BJ_ilha	5697	hydrogenase maturation protein	14.5
BJ_ilha	5698	NoI protein	14.7
BJ_ilha	5699	DNA invertase	10
BJ_ilha	5701	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5702	RhcV protein	4.6
BJ_ilha	5703	6-O-carbamoyl transferase	14.7
BJ_ilha	5704	DNA invertase	10
BJ_ilha	5705	nif-specific regulatory protein	5.3
BJ_ilha	5706	putative transposase	14.6
BJ_ilha	5707	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5708	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5709	transcriptional regulatory protein Fis family	9
BJ_ilha	5710	uptake hydrogenase large subunit homolog	14.5
BJ_ilha	5711	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5712	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5713	exonuclease subunit SbcC homolog	10
BJ_ilha	5714	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5715	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5716	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5717	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5718	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5720	putative peptidase	14.8
BJ_ilha	5721	two component regulator	14.7

BJ_ilha	5722	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5723	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5724	unknown protein	15.2
BJ_ilha	5725	hypothetical protein	15.1
BJ_ilha	5726	probable peptide synthetase	12.5

VI. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. G. P. *et al.* A System for Automated Bacterial (genome) Integrated Annotation — SABIA. *Bioinformatics*. vol 20, 16:2832-2833, 2004.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BERINGER, J.E. A factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology New York*, v.84, p.188-198, 1974.
- CANTAO, M. E.; FERREIRA, J. E.; LEMOS, E. G. M. Optimal clone identifier for genomic shotgun libraries: "OC Identifier tool". *Genetics and Molecular Research*. v.6. n.4, p. 743-755. 2007.
- CAPELA, D. *et al.* Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiotic *Shinorhizobium meliloti* strain 1021, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98; p. 9877-9882. 2001.
- DAZZO, F.B. *et al.* Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* – clover symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, p.1140-1150, 1984.
- DOBRINDT, U. *et al.* Genomic island in pathogenic and environmental microorganismos. v. 2, p. 414 – 424. 2004.
- EWING, B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, p.186-194, 1998.
- FISCHER, H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews*, v.58, p.352-386.
- FREIBERG, C. *et al.* Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, v.387, p.394-401, 1997.

- GALIBERT, F. *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, v.293, p.668-672, 2001.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, v.8, p.195-202, 1998.
- GÖTTFERT, M. *et al.* Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Journal of Bacteriology*, v.183, p.1405-1412, 2001.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing osymbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research*, v.7, p.331-338, 2000.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, v.9, p.189-197, 2002a.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Supplement). *DNA Research*, v.9, p.225-256, 2002b.
- KEEN, N.T. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Annual Review of Microbiology*, v.42, p.421-440, 1988.
- KISHI, L. T. *et al.* Avaliação do tamanho do genoma de *Bradyrhizobium elkanii* por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos : XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005. v. 23. p. 277.
- KÜNDIG, C.; HENNECK, H.; GÖTTFERT, M. Correlated physical and genetic map of the *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. *Journal of Bacteriology*, v.175, p. 613-622, 1993.

- KURTZ, S. *et al.* Software: Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, 5:R12, 2004.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura. Disponível em: http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_060701.htm, 2001.
- OKE, V.; LONG, S.R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, v.2, p.641-646, 1999.
- PERRET, X; STAEHELIN, C.; BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.180-201, 2000.
- REDMOND, J. W. *et al.* Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*, v.323, p.632-635, 1986.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S. R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*: Holos Editora, 2001. p. 130-136.
- SCHAFFER, H. E. e SEDEROFF, R. R. Improved estimation of DNA fragments lengths from agarose gels. *Analytical Biochemistry*, v.115, p. 113-122. 1981.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SOUZA, J. A. M. Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 in vitro e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA. PhD thesis. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 139 p. 2006.
- VARGAS, M. A. T. *et al.* Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja. Comunicado Técnico: EMBRAPA-CPAC, Planaltina, v.62, 3p., 1992.