

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

**METABOLISMO RESPIRATÓRIO DE BRADIRRIZÓBIOS
DURANTE PROCESSOS *IN VITRO* E SIMBIÓTICO ANALISADO
POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.**

Wellington Marcelo Queixas Moreira
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2009

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

**METABOLISMO RESPIRATÓRIO DE BRADIRRIZÓBIOS
DURANTE PROCESSOS *IN VITRO* E SIMBIÓTICO ANALISADO
POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.**

Wellington Marcelo Queixas Moreira

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Co-Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária (Microbiologia).

JABOTICABAL – SP.
JULHO DE 2009

M838m Moreira, Wellington Marcelo Queixas
Metabolismo respiratório de bradirrizóbios em processos "*in vitro*"
e simbióticos analisados por PCR quantitativo em tempo real /
Wellington Marcelo Queixas Moreira. – – Jaboticabal, 2009
xv, 81 f. : il. 31 ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Emanuel Maltempi de Souza, Jesus
Aparecido Ferro
Bibliografia

1. *Bradyrhizobium*. 2. Metabolismo respiratório. 3. Expressão
Gênica. 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.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Wellington Marcelo Queixas Moreira – nascido em Bebedouro (SP), em 24 de fevereiro de 1983, graduou-se em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas FAFIBE em Bebedouro (SP), no ano de 2004. Ingressou no Curso de Especialização, em 2006, recebendo o título de Especialista em Biologia Molecular e Biotecnologia, pela Universidade de Franca (UNIFRAN) em junho de 2007. Em agosto de 2007, iniciou o Mestrado, no curso de Pós-graduação em Microbiologia, Área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal (SP).

**“Aquilo que guia e arrasta o mundo não são as máquinas,
mas as idéias.”**

Victor Hugo

Aos meus pais João e Marli, por toda dedicação,
educação e confiança sempre.
E a meus familiares e amigos

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS e a minha família

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação, paciência, incentivo, confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, grande mestre e amigo por todo suporte, idéias e incentivo no decorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves pelo auxílio e amizade.

Ao Dr. João Carlos Campanharo pelos constantes auxílios.

Ao professor Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino do Laboratório de Microbiologia – Anaeróbios por todo apoio em alguns experimentos

À amiga Karla Cristina Stropa pela amizade e colaboração no decorrer deste e de outros trabalhos.

À Gabriela Sanches Perez pelo incentivo e apoio sempre.

A todos os companheiros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas pela amizade e por tudo mais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

E o meu obrigado a todos que direta ou indiretamente sempre contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Inoculantes	6
2. Processo simbiótico	10
3. Genes envolvidos na simbiose e regulação da fixação biológica do nitrogênio	12
4. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	18
Parte I – Análises Bioquímicas e Fisiológicas das culturas <i>in vitro</i> de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , inoculantes comerciais e bacterióides	18
1. Descrição das amostras experimentais e suas finalidades	18
a) Amostras para teste de restrição de oxigênio	18
b) Inoculantes comerciais	18
c) Bacterióides.....	18
d) Manutenção das estirpes de <i>B. elkanii</i>	19
2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. elkanii</i> sob diferentes condições de aeração	19
a) Experimento de restrição de Oxigênio	19
b) Ensaio Respiratório pela redução de INT	20
c) Análises Microscópicas	21
3. Análise das características dos Inoculantes	21
4. Ensaio de Nodulação	22
a) Inoculação das Plantas	22
b) Isolamento de Bacterióides	22
Parte II – Análises da expressão gênica das culturas <i>in vitro</i> de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , inoculantes comerciais e bacterióides por PCR quantitativo em tempo real	22
1. Extração de RNA total de bactérias e bacterióides	22
2. Análise da Expressão Gênica por PCR quantitativo em tempo real	23

a) Síntese de cDNA	23
b) Descrição dos genes alvos e do controle endógeno aplicados nas análises de quantificação relativa	24
c) Quantificação Relativa da expressão gênica	25
d) Análise dos Dados	25
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
Parte I: Análises bioquímicas e fisiológicas para os diferentes cultivos de <i>B. elkanii</i> , isoladamente	27
1. Determinação do número de células, pH e DO a 600 nm	27
2. Ensaio bioquímico de cinética respiratória através da redução de INT a INT-Formazan dos experimentos de restrição de oxigênio	29
3. Análises Microscópicas	35
4. Perfil de qualidade do RNA total bacteriano	37
Parte II: Análises bioquímicas e fisiológicas para os inoculantes a base de bradirrizóbios	39
1. Análises das características dos inoculantes em diferentes idades	39
2. Ensaio bioquímico da atividade respiratória através da redução de INT a INT-Formazan dos inoculantes	41
3. Experimento de Nodulação com plantas de soja inoculadas com Inoculante Líquido comercial	42
4. Perfil de qualidade do RNA total isolado dos bradirrizóbios presentes nos inoculantes comerciais e de bacterióides isolados de plantas de soja	44
PARTE III: Análise da expressão de genes envolvidos no processo respiratório de bradirrizóbio <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> , por meio de quantificação relativa em PCR tempo real	47
1. Ensaio de validação de Primers, eficiência de cDNA e ensaio de Dissociação.	47
2. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa relativa em Tempo Real	50

3. Fisiologia de bradirrizóbios <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	60
V. CONCLUSÕES	67
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Processo de estabelecimento da simbiose	11
Figura 2: Jarra de anaerobiose	20
Figura 3: Densidade ótica das amostras de <i>B. elkanii</i> cultivadas em diferentes atmosferas gasosas	27
Figura 4: Análise da densidade ótica a 480 nm do extrato etanólico proveniente das culturas em diferentes atmosferas gasosas	30
Figura 5: Extratos etanólicos INT-Formazan	31
Figura 6: Cascatas regulatórias de ativação gênica em ambientes com baixa tensão de oxigênio	33
Figura 7: Análise microscópica das células de <i>B. elkanii</i> crescidas aerobicamente cultivadas 24 e 48 horas.....	35
Figura 8: Análise microscópica das células de <i>B. elkanii</i> crescidas microaerobicamente cultivadas 24 e 48 horas.....	36
Figura 9: Análise microscópica das células de <i>B. elkanii</i> crescidas anaerobicamente cultivadas 24 e 48 horas.....	36
Figura 10: Análise microscópica de <i>B. elkanii</i> evidenciando o acúmulo intracelular de INT-Formazan	36
Figura 11: Perfil de qualidade do RNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 cultivada 24 horas em diferentes concentrações de oxigênio	37
Figura 12: Perfil de qualidade do RNA total de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 cultivada 48 horas em diferentes concentrações de oxigênio	38
Figura 13: pH dos inoculantes analisados nos ensaios biológicos	40
Figura 14: Análise da densidade ótica dos inoculantes	41
Figura 15: Análise da densidade ótica do extrato etanólico	42
Figura 16: Extratos etanólicos INT-Formazan	42
Figura 17: Nodulação de raízes de plantas de soja (<i>Glycine max</i>)	44
Figura 18: Perfil de qualidade do RNA total de inoculantes	45

Figura 19: Perfil de qualidade do RNA total de bacterióides	46
Figura 20: Curvas de dissociação para validação da eficiência dos primers	49
Figura 21: Análise da Expressão Gênica de <i>fixL</i>	51
Figura 22: Análise da Expressão Gênica de <i>fixJ</i>	53
Figura 23: Análise da Expressão Gênica de <i>fixK₂</i>	54
Figura 24: Papel central de <i>fixK₂</i>	55
Figura 25: Análise da Expressão Gênica de <i>rpoN₁</i>	56
Figura 26: Análise da Expressão Gênica de <i>nifA</i>	57
Figura 27: Análise da Expressão Gênica de <i>fixN</i>	58
Figura 28: Análise da Expressão Gênica de <i>nifH</i>	59
Figura 29: Taxas de expressão gênica para as culturas cultivos restritivos em O ₂ ..	60
Figura 30: Taxas de expressão gênica para inoculantes em diferentes idades	61
Figura 31: Taxas de expressão gênica para bacterióide	61

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de qPCR	24
Tabela 2: Análise das características em diferentes cultivos de <i>B. elkanii</i>	28
Tabela 3: Rendimento médio de RNA total obtido de células de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587, durante 24 e 48 horas em diferentes condições de oxigenação	38
Tabela 4: Número de células/ml para amostras de inoculantes	39
Tabela 5: Rendimento médio de RNA total obtido de células de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079, em inoculantes	45
Tabela 6: Rendimento médio de RNA total obtido de bacterióides.....	47

METABOLISMO RESPIRATÓRIO DE BRADIRRIZÓBIOS DURANTE PROCESSOS *IN VITRO* E SIMBIÓTICO ANALISADO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

RESUMO - O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, cuja cultura requer o elemento nitrogênio em quantidades elevadas para manutenção do alto teor protéico dos grãos. A entrada de nitrogênio nos sistemas agrícolas pode ocorrer pela adição de fertilizantes nitrogenados ou por processos naturais como a Fixação Biológica do Nitrogênio, que se constitui como supridor de nitrogênio mais viável para a cultura da soja, tanto economicamente como ecologicamente. Este processo ocorre graças à simbiose que ocorre entre esta leguminosa e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, resultando na formação de nódulos radiculares onde se dá a obtenção de todo o nitrogênio que a cultura necessita para alta produtividade. A introdução destas bactérias no solo se dá através da utilização de inoculantes comerciais, que incluem as bactérias *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* em sua composição. Aspectos relacionados à formulação e fabricação dos inoculantes comerciais reúnem os fatores mais importantes para a obtenção de um produto de qualidade, obedecendo à legislação vigente. Tendo em vista a análise de qualidade de inoculantes comerciais para soja em diferentes períodos de armazenamento, um estudo do metabolismo respiratório de bradirrizóbios foi realizado *in vitro* e em simbiose. Inoculantes comerciais com 12, 27 e 48 meses de idade foram analisados quanto suas características bioquímicas e fisiológicas, assim como testados em casa de vegetação. Adicionalmente, os mesmos testes foram realizados com *Bradyrhizobium elkanii* sob diferentes condições de oxigênio. Análise da expressão gênica indicou que um processo de expressão de genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio (genes sensores a baixas tensões de oxigênio) foram expressos, entretanto não ocorrendo expressão do gene *nifH*, este só expresso em condições de simbiose. Dados similares foram encontrados para a expressão dos mesmos genes em *B. elkanii* crescida em diferentes níveis de oxigênio. Estes dados indicam que à medida que a concentração de oxigênio abaixa, alguns genes envolvidos nos processos de fixação são expressos,

entretanto os genes finais responsáveis pela síntese do complexo nitrogenase apenas expresso em simbiose.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, qPCR em tempo real, expressão gênica, metabolismo respiratório

RESPIRATORY METABOLISM OF BRADYRHIZOBIA *IN VITRO* AND IN ASSOCIATION WITH SOYBEAN PLANTS ANALYZED BY REAL-TIME PCR QUANTIFICATION

SUMMARY - Brazil is the second major soybean producer in the world, whose culture requires the element nitrogen in large amounts for the maintenance of the high protein content in grains. The input of nitrogen in agricultural systems can occur by adding nitrogen fertilizer or by natural processes such as biological nitrogen fixation (BNF). BNF is the most feasible way to delivery nitrogen for the soybean crop, both economically and ecologically. This process occurs through the symbiosis between the legume and the bacteria of the genus *Bradyrhizobium*, resulting in the formation of root nodules where all nitrogen that the crop needs for high productivity is acquired. The introduction of these bacteria in soil is given by use of commercial inoculants, which include the bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* in its composition. Aspects related to formulation and manufacture of inoculants include the most important factors affecting the product quality, according to law. In order to analysis of the quality of commercial inoculants for soybean in different storage periods, a study of respiratory metabolism of bradyrhizobia was performed in vitro and in symbiosis. Inoculants with 12, 27 and 48 months old were analyzed accessing their biochemical and physiological characteristics, and tested at greenhouse. In addition, the same tests were conducted on cultures of *Bradyrhizobium elkanii* under different oxygen conditions. Analysis of gene expression have indicated that genes related to biological nitrogen fixation (genes sensors at low oxygen tension) were intensively expressed, but not occurring nifH gene expression which is only expressed under symbiosis. Similar data were found for the expression of these genes when *B. elkanii* grown at different oxygen tensions. These data indicate that as the oxygen level is reduced some genes related to nitrogen fixation are expressed, however, the genes responsible for final synthesis of the nitrogenase complex are only expressed in symbiosis.

Key-words: *Bradyrhizobium*, quantitative real-time PCR, gene expression, respiratory metabolism.

I. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), leguminosa da família Fabaceae (DELORIT & GUNN, 1986), é considerada uma das mais importantes fontes de proteína e óleo vegetal, os quais são constituintes de seus grãos. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com uma produção prevista para a safra de 2009 de 57.137,4 mil toneladas, em uma área cultivada de 21.730,5 mil hectares (CONAB, 2009). Razão pela qual esta é a cultura de maior importância econômica para o país (CHUEIRE et al., 2003)

A soja possui um alto teor protéico, em torno de 42% em algumas sementes (PANIZZI & MANDARINO, 1994). Dado o elevado teor protéico presente nos grãos de soja, o nitrogênio é o elemento requerido em maior quantidade por esta cultura. O fornecimento deste nutriente, entre outros, é responsável pelo bom desenvolvimento desta cultura (CATTELAN & HUNGRIA, 1994). Adicionalmente, o nitrogênio é constituinte essencial de aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas (CRAWFORD et al., 2000).

O nitrogênio corresponde ao quarto elemento mais abundante nos seres vivos. A entrada de nitrogênio nos sistemas agrícolas pode ocorrer através da adição de fertilizantes nitrogenados. Contudo, um complexo ciclo biogeoquímico deste elemento permite sua incorporação através de processos naturais como fixação atmosférica e deposição pela chuva ou a Fixação Biológica do Nitrogênio – FBN (ARAÚJO, 2006).

Para o suprimento da demanda por alimentos, têm-se adotado a utilização de práticas agrícolas que podem agredir o solo que é a fonte para a produção das mais diversas culturas. Desta forma, a degradação química, física e biológica do solo são os principais fatores que afetam a sustentabilidade de culturas (CAMPO & HUNGRIA, 2004). A situação ainda é mais séria nos trópicos, devido à fragilidade do solo, erosão, baixo nível de matéria orgânica e tecnologias inapropriadas de utilização do solo, além do alto custo dos fertilizantes, especialmente nitrogênio (N),

que na maioria das vezes é importado (CASSMAN, 1999; HUNGRIA & VARGAS, 2000; GILLER, 2001).

No Brasil, a FBN constitui a fonte de nitrogênio mais viável para a cultura da soja, tanto economicamente como ecologicamente. Espécies vegetais produtoras de grãos, como a soja, destacam-se quanto ao seu potencial para formar simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico (N_2), podendo dispensar, total ou parcialmente a adubação nitrogenada e ainda contribuir para outras espécies em sucessão, garantindo a auto-sustentabilidade do ecossistema com relação ao nitrogênio disponível no solo (HUNGRIA et al., 1994). Este processo simbiótico ocorre entre esta leguminosa e algumas bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, resultando na formação de nódulos radiculares onde se dá a obtenção de todo o nitrogênio que a cultura necessita para alta produtividade (ARAÚJO, 1997; ZILLI et al. 2005).

Durante a simbiose com leguminosas, as bactérias devem entrar nas células das raízes da planta hospedeira e se diferenciar para a forma fixadora de nitrogênio, denominada bacterióide. Tipicamente esta entrada ocorre via pêlos radiculares através do cordão de infecção, onde penetrarão até atingir as células do córtex da raiz da planta, se instalando em um novo órgão chamado nódulo radicular (LODWIG & POOLE, 2003). Os processos de nodulação, diferenciação em bacterióide e fixação do nitrogênio envolvem a expressão de genes do hospedeiro e do simbiote. A disponibilidade de carbono da planta para os bacterióides ocorre na forma de ácidos dicarboxílicos. Por sua vez, o microrganismo sintetiza e ativa o complexo enzimático nitrogenase e outras proteínas acessórias, como citocromos, que atuam no ambiente de baixa tensão de oxigênio do nódulo permitindo a fixação biológica do nitrogênio (OKE & LONG, 1999; LODWIG & POOLE, 2003).

Atualmente, quatro estirpes são recomendadas oficialmente no Brasil para a utilização nos inoculantes comerciais: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019; *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Avaliações conduzidas na maioria das regiões produtoras de soja brasileiras mostraram que estas estirpes

possuem alta eficiência em fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com plantas de soja (ZILLI et al., 2005).

A qualidade do inoculante está condicionada ao tipo de veículo ou suporte, à quantidade do microrganismo fixador e, fundamentalmente, às condições ambientais a que o produto é submetido até a sua utilização ou durante sua aplicação. (ARAÚJO, 1993).

O sucesso da inoculação depende da qualidade dos inoculantes comerciais, os quais devem ser fabricados com estirpes recomendadas pelos laboratórios de pesquisa credenciados e apresentarem uma quantidade mínima de células de rizóbio ($1,0 \times 10^9$ células viáveis por grama ou mililitro do veículo) (FREIRE, 1992; HUNGRIA et al., 1997b). A maximização da simbiose pode ser alcançada através da inoculação com estirpes de rizóbios com características selecionadas. Adicionalmente, uma inoculação bem sucedida dependerá da capacidade das novas estirpes em competir com as estirpes naturalizadas do solo (OLIVEIRA & VIDOR, 1984 a,b; VARGAS & HUNGRIA, 1997). Dessa forma, não somente o número inicial de células da bactéria é importante, mas principalmente o número que entra em contato com a semente durante a germinação.

Para que a simbiose se estabeleça através de um processo de nodulação bem sucedido, a bactéria necessita de condições adequadas para a sua sobrevivência, desde a saída da fábrica até o momento da inoculação. Muitas vezes essas condições não são atendidas, reduzindo o número de bactérias viáveis no inoculante (CAMPOS, 1999). Quando o inoculante é disponibilizado no solo, a bactéria deve alterar toda a sua maquinaria bioquímica tendo em vista as novas condições metabólicas a que será submetida no solo e no interior da planta (LODWIG & POOLE, 2003).

O fato da estirpe 587 de *Bradyrhizobium elkanii* ser uma das estirpes recomendadas para a fabricação de inoculantes comerciais para soja levou o grupo do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas (UNESP – Jaboticabal/SP) a sequenciar o genoma de *B. elkanii* SEMIA 587, para futuras análises transcricionais. Baseado em um microarranjo piloto de DNA Be587, ou seja,

parcial, análises transcriptômicas vêm sendo realizadas para estudos de diferentes condições metabólicas desta bactéria *in vitro* e em simbiose. Análises transcriptômicas realizadas por Souza (2006) em duas condições diferentes de cultivo trouxeram perspectivas promissoras para análises funcionais de genes independentes ou de conjuntos de genes, envolvidos em determinada função ou via metabólica.

Em resposta a diferentes condições nutricionais, observadas nas diferentes fases de cultivo bacteriano, destacaram-se genes relacionados ao metabolismo respiratório. Em particular, genes envolvidos no processo respiratório em ambiente de baixa tensão de oxigênio foram detectados em cultura líquida. Uma citocromo-c oxidase simbiótica, *fixN*, foi detectada em meio RDM (BISHOP, 1976) durante a fase log. Os genes *fixNOQP* codificam uma citocromo-c oxidase especificamente requerida para a respiração do bacterióide (FISCHER, 1994). A hipótese de um ambiente microaerofílico pode ser corroborada pela detecção de genes para superóxido dismutase e catalase em meio TY, respectivamente nas fases lag e estacionária, em que o crescimento bacteriano pronuncia-se mais rapidamente (SOUZA, 2006).

A indução de genes envolvidos na simbiose e fixação do nitrogênio, durante o cultivo de *Bradyrhizobium elkanii* deve ser considerada ao avaliar preparações de inoculantes comerciais. A simulação de um ambiente com baixa tensão de oxigênio pode estar acontecendo dentro das embalagens comerciais, durante a estocagem do produto líquido. Assim, o mesmo processo de indução destes genes, observado nas culturas analisadas, poderia vir a ocorrer nas formulações de inoculantes líquidos (SOUZA, 2006).

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo do metabolismo respiratório de bradirrizóbios em inoculantes líquidos comerciais para soja, em diferentes períodos de armazenamento, e em bacterióides extraídos de plantas de soja. Um estudo da atividade respiratória em *B. elkanii* foi realizado através de seu cultivo em diferentes condições de oxigenação. Este estudo foi realizado através de análises bioquímicas e fisiológicas, além da análise da expressão de sete genes envolvidos na respiração

microaeróbia e na fixação simbiótica do nitrogênio, a saber, genes *fixN*, *fixL*, *fixK₂*, *fixJ*, *nifA*, *nifH* e *rpnO₁*, através da técnica de PCR quantitativo em tempo real. A análise de expressão gênica foi estendida para amostras de inoculantes comerciais e bacterióides.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Inoculantes

Avaliações realizadas em diversas regiões produtoras de soja indicam que a FBN é responsável por mais de 80% do nitrogênio acumulado pela planta (MACEDO, 2003), o que significa um volume de 110 a 250 kg/ha a cada safra. Isto demonstra que o sucesso desta cultura, no Brasil, em grande parte se deve à eficiente exploração da FBN (ZILLI et al., 2005).

Em geral, considerava-se que os solos brasileiros eram originalmente isentos de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de formar uma simbiose efetiva com a soja. Contudo, sabe-se que a estringência para nodulação com bactérias nativas deve-se principalmente ao fator de competitividade no solo (VARGAS et al., 1993). A capacidade de fixação de N_2 sempre foi levada em consideração desde que se iniciou a produção da soja em escala comercial no Brasil. Embora a indicação das estirpes para inoculação seja baseada em estudos de seleção de estirpes de comprovada eficiência fixadora de nitrogênio, de permanência no solo e resistência a fatores limitantes, tem-se observado que o cultivo sucessivo de soja inoculada numa mesma área levou ao estabelecimento de populações de rizóbios que nem sempre são as mais eficientes quanto à capacidade de fixação de N_2 . Contudo, elas podem ser altamente competitivas, dificultando a introdução de estirpes mais eficientes, ainda que estas estejam presentes em maior quantidade (VARGAS et al., 1994). Sendo assim, a cada ciclo da cultura, faz-se necessário a introdução dessas bactérias fixadoras no solo, o que pode ser feito através da utilização de inoculantes a base de bradirrizóbios (MENDES & HUNGRIA, 2001).

Logo após o isolamento dos primeiros rizóbios dos nódulos de soja por Beijerinck, dois outros pesquisadores alemães, Nobbe e Hitner, demonstraram em 1890 vantagens em se adicionar culturas puras de bactérias em sementes durante o plantio. Em 1896 estes cientistas submeteram a primeira patente para culturas puras de rizóbios para inoculação artificial, descrevendo o uso de culturas puras de *Rhizobium* crescidas em garrafas de vidro com pequenas quantidades de meio de

cultura gelatinoso. Isto levou ao início da indústria de inoculantes comerciais e estabelecimento da primeira companhia em 1898 nos Estados Unidos (VOELCKER, 1986; SMITH, 1992). Progressos na indústria dos inoculantes foram observados nas décadas seguintes e as bactérias para uma produção em larga escala foram encontradas (CAMPO & HUNGRIA, 2004).

Com a expansão da cultura da soja no Brasil, na década de 70, foi necessário importar inoculantes comerciais, particularmente dos EUA. Felizmente, a avaliação do desempenho simbiótico de diversas estirpes nativas brasileiras e a seleção daquelas mais eficientes para os cultivares nacionais de soja iniciou-se imediatamente (HUNGRIA et al. 1994).

A seleção das estirpes que devem compor os inoculantes comerciais para soja foi derivada do trabalho de muitos pesquisadores, em diversas instituições. A partir de 1985, um grupo formado por pesquisadores do Rio Grande do Sul fundou um grupo que agrega também produtores de inoculantes e representantes do Ministério da Agricultura. Este grupo tem se expandido e reúne-se a cada dois anos para analisar os resultados das pesquisas em seleção, recomendação de estirpes, controle de qualidade e outros temas de interesse da rizobiologia. Em 1992, este grupo foi reconhecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e definido como RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Desde então, a FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/RS) é a instituição responsável pela manutenção e distribuição das estirpes recomendadas, enquanto o MAPA legaliza e rege a legislação para a produção de inoculantes comerciais, em âmbito federal. Dados da FEPAGRO apontam que desde 1956 as estirpes de bradirrizóbios são utilizadas para inoculação de soja no Brasil.

A partir de 1980, quando se iniciou a expansão das culturas de soja nos cerrados, os inoculantes comerciais passaram a conter apenas as estirpes brasileiras SEMIA 587 e SEMIA 5019, principalmente pela alta eficiência dessas estirpes em nodular todas as variedades de soja (VARGAS et. al, 1993). A partir de 1992, as

SEMIA 5079 (CPAC 15) isolada de campos de cerrado e a SEMIA 5080 (CPAC 7), foram incluídas na recomendação oficial de inoculantes comerciais para a cultura da soja (JARDIM-FREIRE & VERNETTI, 1999; JARDIM-FREIRE et al, 2006). RUMJANEK et al. (1993) classificou as estirpes brasileiras 29W (SEMIA 5019) e 587 (SEMIA 587) como pertencentes à espécie *Bradyrhizobium elkanii* baseado na similaridade de sequências 16S rDNA.

Estirpes altamente efetivas na fixação de nitrogênio são a primeira exigência na produção de inoculantes de alta qualidade. As estirpes recomendadas devem ter a capacidade de nodular leguminosas e fixar nitrogênio sob várias condições. Entretanto, o critério de seleção pode variar dependendo do tipo de solo e condições ambientais, entre outros (FREIRE & SCHOLLES, 1996). A ocorrência de mutações espontâneas nas estirpes das coleções de culturas de rizóbios e bradirrizóbios é outro fator que tem comprometido o processo simbiótico, uma vez que esta variabilidade representa um problema potencial para a manutenção e indicação de estirpes para estudos de taxonomia e fabricação de inoculantes (BANGEL, 2000).

Atualmente, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (GARRITY, 2005), baseado na análise filogenética da sequência do 16S rDNA, os seis gêneros de rizóbios estão distribuídos em quatro famílias, a saber: *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Ensifer*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*) e *Hyphomicrobiaceae* (*Azorhizobium*). A base para os estudos de genética da fixação biológica do nitrogênio, nas associações simbióticas, foi constituída por bactérias destes gêneros descritos. A espécie *Bradyrhizobium elkanii* foi descrita por KUYKENDAL et al. (1992) e a classificação sistemática atual da mesma é descrita a seguir. REINO: Eubactéria, FILO: *Proteobacteria*, CLASSE: *Alpha Proteobacteria*, ORDEM: *Rhizobiales*, FAMÍLIA: *Bradyrhizobiaceae*, GÊNERO: *Bradyrhizobium*, ESPÉCIE: *Bradyrhizobium elkanii*. Este gênero engloba adicionalmente as espécies *B. betae*, *B. canariense*, *B. japonicum*, *B. liaonigense*, *B. yuanmingense*, *B. denitrificans*, entre outras ainda não completamente classificadas taxonomicamente (EUZÉBY, 2009)

Os inoculantes até o início desta década eram na sua maioria preparados com turfa finamente moída. Problemas com a qualidade do inoculante eram frequentemente atribuídos a utilização de turfa não esterilizada (VARGAS & HUNGRIA, 1997). E a utilização desta turfa, pode causar diversos efeitos negativos como competição dos rizóbios com outros microrganismos, decréscimo no prazo de validade do inoculante e, além disso, dificulta o controle de qualidade do mesmo. Todos estes fatores contribuíram para que os inoculantes líquidos crescessem e ganhassem o mercado. A utilização de inoculantes comerciais na forma líquida é mais promissora, o qual vem apresentado em embalagens que consistem de frascos plásticos, que mantém na sua formulação as células viáveis durante o período de seu armazenamento. O prazo de validade dos inoculantes comerciais é de no mínimo seis meses após sua fabricação (MAPA, 2006) e a aplicação é realizada diretamente na semente ou via sulco de plantio.

O desenvolvimento de tecnologia visando a produção de inoculantes líquidos se tornou importante para a diminuição dos custos de produção e para a real utilização desse insumo pelos produtores de soja. Dessa maneira, uma formulação líquida contendo rizóbios fixadores biológicos de nitrogênio em soja foi desenvolvida. Essa formulação permite a manutenção da viabilidade dessa bactéria, livre de contaminação, mais econômica e com maior facilidade de aplicação nas sementes no momento do plantio. Paralelamente foram desenvolvidas formulações para aplicação de estirpes em inoculantes via sulco de plantio. Estas formulações foram enriquecidas com componentes direcionados para o fortalecimento da estrutura celular das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* objetivando maior vigor e consequente longevidade no solo, como por exemplo, adição de trealose, um dissacarídeo utilizado como osmoprotetor e com papel na tolerância e sobrevivência das células a estoque e dessecação (STREETER, 2003)

Atualmente, a legislação que rege a produção de inoculantes é regulamentada pelas instruções normativas nº 5 (10/08/2004) e nº 10 (24/03/2006), registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2. Processo simbiótico

A colonização de tecidos vegetais, estabelecimento de relações simbióticas ou parasíticas e a compatibilidade entre microrganismos e hospedeiros são eventos complexos que requerem informações genéticas específicas. Genes envolvidos em cada processo permitem que tais microrganismos infectem e se desenvolvam no hospedeiro, obtendo nutrientes e evitando mecanismos de defesa vegetal (ELLINGBOE, 1981; KEEN, 1988).

A infecção de raízes de certas plantas leguminosas por bactérias fixadoras de nitrogênio resulta na formação de estruturas especializadas denominadas nódulos, onde se estabelece a simbiose rizóbio/leguminosa. Nestes nódulos, o nitrogênio atmosférico é reduzido às formas assimiláveis pela planta, as quais são transportadas para outros órgãos vegetais (KEEN, 1988). Os rizóbios no solo são atraídos em direção às raízes hospedeiras por um quimiotactismo positivo. Isto se dá devido à secreção de flavonóides pela planta que ativam genes chamados *nod*, os quais também atuam na expressão de fatores envolvidos no reconhecimento ao hospedeiro, além de genes envolvidos na formação do nódulo (LONG, 1996)

Dentro dos pêlos encurvados, os fatores Nod promovem a formação dos cordões de infecção pelas quais as bactérias invadem as plantas. O cordão de infecção contendo um grande número de células de rizóbio cresce em direção ao primórdio do nódulo. Quando esta via alcança essas células, ela funde-se com a membrana da célula hospedeira. A via de infecção pode ramificar-se, de forma que várias células do hospedeiro sejam colonizadas por rizóbios (PERRET et al. 2000; LODWIG & POOLE, 2003). Após o início do estabelecimento do nódulo radicular e infecção das células por rizóbios, uma vesícula simbiótica denominada simbiossoma ou unidade peribacterióide é formada, na qual as bactérias colonizadoras passam por um processo de diferenciação que gera a forma especializada na fixação de nitrogênio, o bacterióide (FIG. 1)

Bacterióides maduros reduzem nitrogênio atmosférico através de um processo altamente energético, suprido pela provisão de carbono da planta. A regulação do metabolismo do bacterióide no ambiente nodular, com baixa tensão de oxigênio,

requer um balanceamento preciso de energia, agentes redutores e fontes de carbono para permitir taxas ótimas de fixação do nitrogênio (PAAU et al. 1980; VASSE et al. 1990; LODWIG & POOLE, 2003).

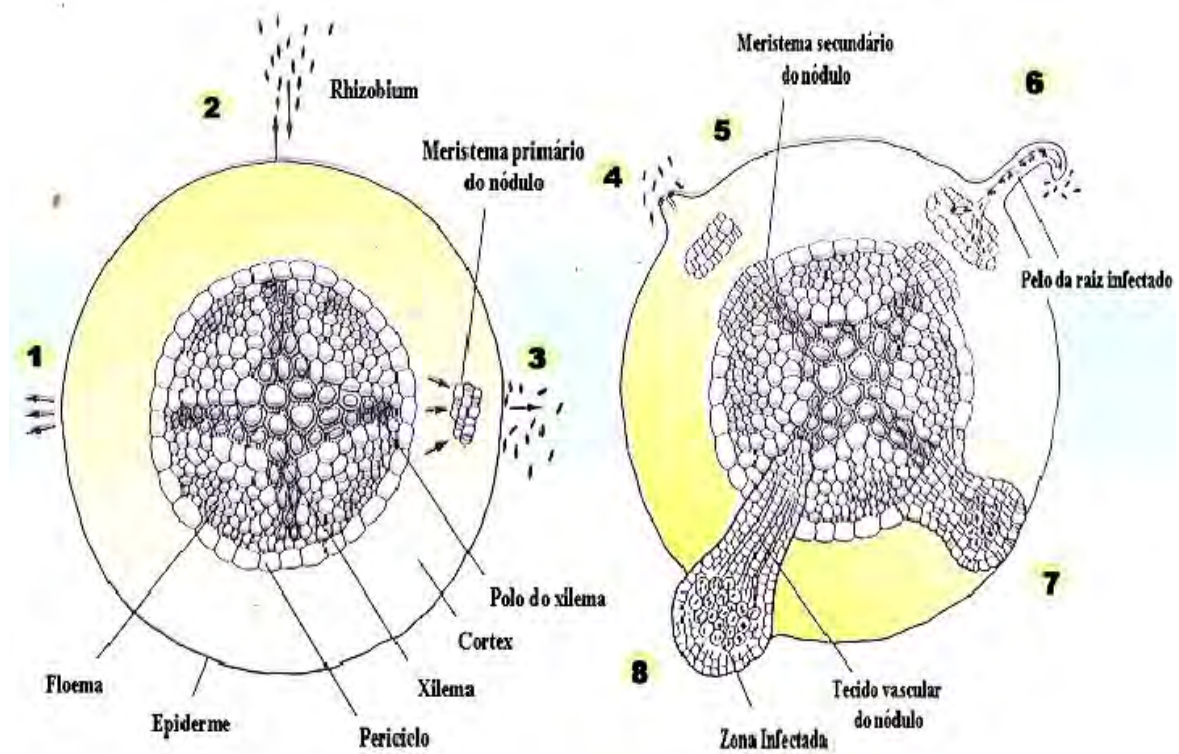


Figura 1: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios (Adaptado de: www.plantphys.net).

1. Liberação de flavonóides pelas raízes da planta;
2. Quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície das raízes;
3. Proliferação do rizóbio na rizosfera e indução da diferenciação nodular
4. Aderência do rizóbio às raízes;
5. Diferenciação do meristema secundário do nódulo (conexão vascular);
6. Encurvamento do pêlo radicular e formação da via de infecção;
7. Múltipla infecção das células do nódulo e crescimento do nódulo;
8. Crescimento do nódulo, diferenciação dos bacterióides e começo da fixação simbiótica de nitrogênio.

Bacterióides sintetizam o complexo da enzima nitrogenase para catalisar a redução do dinitrogênio através da reação descrita no quadro a seguir (BURRIS, 1974; CRAWFORD, 2000).



Este processo de simbiose pode ser fortemente influenciado pela acidez do solo, seca, baixos níveis de fósforo (P) ou altos níveis no solo de nitrogênio, prejudicando todo o processo que ocorre entre rizóbio e hospedeiro, além de influenciar a sobrevivência rizobiana (GRAHAM, 1992). Um exemplo claro da influência destes fatores pode ser representado pelo pH do solo. Diferenças tanto no hospedeiro quanto na bactéria à tolerância ao pH são observadas em *Medicago* (HOWIESON & EWING, 1989) e *Phaseolus* (GRAHAM et al. 1994; VARGAS E GRAHAM, 1988). Rizóbios, planta e pH podem interagir modificando a eficiência do estabelecimento da simbiose (GRAHAM et al. 2004).

3. Genes envolvidos na simbiose e regulação da fixação biológica do nitrogênio

Existem diversos genes envolvidos nos processos de nodulação e fixação de nitrogênio. Os genes responsáveis pelos processos de nodulação estão comumente divididos em duas classes. A primeira engloba genes que estão envolvidos na caracterização da superfície bacteriana e capacidade de nodulação, tais como genes *exo* (exopolissacarídeos), *lps* (lipopolissacarídeos), genes para polissacarídeos capsulares, antígenos K e β -1,2-glucanos e genes *ndv*. Estes genes estão relacionados à especificidade do hospedeiro e estabelecimento do cordão de infecção. A segunda classe de genes corresponde aos envolvidos diretamente na infecção e nodulação, genes *nod*, *nol* e *noe*. Além do reconhecimento do hospedeiro, estes genes são responsáveis pela síntese enzimática de fatores Nod que induzem a formação do nódulo. Alguns destes genes são comuns para todas as espécies de rizóbios, como os *nodABC*, essenciais para a formação dos nódulos. Os genes *nod* foram definidos, com auxílio de macro e micro simbiontes mutantes, pela habilidade das bactérias em formar nódulos em hospedeiros específicos. A expressão destes

genes bacterianos é regulada por um ativador transcricional endógeno NodD, cuja indução se dá através da ação de isoflavonóides, como genisteína e daidzeína no caso de *B. japonicum* (KOSSLAK et al. 1987; PERRET et al. 2000). Já outros são específicos para uma única espécie, tais como os genes *hsn* (*host-specific nod*) (BREWIN, 1991; CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOF, 1991; LONG, 1996).

Outro conjunto de genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio, presentes em rizóbios, são denominados *fix* e *nif*. Estes genes estão envolvidos na resposta ao oxigênio, controle transcricional dos promotores *nif*, síntese e regulação da atividade da nitrogenase, síntese de cofatores e transportadores de elétrons. Eles constituem uma classe bastante heterogênea, incluindo genes envolvidos no desenvolvimento e metabolismo de bacterióides, além de genes envolvidos em processos não exclusivamente relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio. Alguns destes genes inclusive podem estar presentes em organismos não diazotróficos (FISCHER, 1994).

Os genes *fix* e *nif* de rizóbios estão organizados em grupos distintos, cuja estrutura e localização genômica são espécie específicas (VAN RHIJN & VANDERLEYDEN, 1995). Os genes *nifHDK* são os principais genes envolvidos na síntese do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio. Estes genes, e outros genes *nif*, são controlados pelos elementos regulatórios FixL, FixJ, FixK, NifA e RpoN, através de cascatas de ativação integradas e espécie-específica.

Devida à alta demanda energética envolvida na fixação de nitrogênio, e da sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio, faz sentido que os organismos diazotróficos tenham sofisticados mecanismos regulatórios que garantam um ótimo controle da síntese da nitrogenase. A expressão dos genes da fixação do nitrogênio é controlada por cascatas hierarquicamente organizadas. Estas cascatas permitem que a bactéria identifique condições ambientais ótimas para que a fixação do nitrogênio ocorra, transmitindo estas informações e controle a expressão gênica (FISCHER, 1994).

Dada a sensibilidade dos componentes da nitrogenase ao oxigênio, é vantajoso para a bactéria reprimir a transcrição dos genes *nifHDK*, responsáveis pela síntese do complexo nitrogenase, quando os níveis de oxigênio são altos. Além dos níveis de oxigênio, a fixação do nitrogênio é regulada em resposta a concentração de amônio no ambiente podendo inibir o processo de nodulação. Também é vantajoso reprimir a expressão da nitrogenase quando os níveis de nitrogênio fixado são suficientemente altos intracelularmente em fixadores de vida-livre (HALBLEIB & LUDDEN, 2000).

O controle dos genes para expressão da nitrogenase e funções acessórias envolvem um tipo de promotor especializado, com seqüências conservadas -24/-12, uma RNA polimerase contendo o fator σ^{54} , codificado pelo gene *rpoN*, ou *ntrA*, e uma proteína ativadora codificada pelo gene *nifA* (FISCHER, 1994). Os genes responsáveis pela detecção e transdução do sinal de condições de baixo teor de oxigênio são os genes *fixL* e *fixJ*, que codificam respectivamente as proteínas FixL e FixJ (MONSON et al. 1992). FixL em baixa tensão de oxigênio se autofosforila e fosforila FixJ, que finalmente ativa a expressão de *fixK* e *nifA*. A proteína FixK ativa vários genes ou operons como o *fixNOQP*, que são responsáveis pela síntese de uma oxidase terminal para a respiração em condições microaróbicas, bem como em nódulos radiculares de legumes (HENNECKE et al., 1998; DIXON & KAHN, 2004).

Uma variedade de mecanismos evoluíram para regular a transcrição do regulador NifA, dependente da concentração de oxigênio celular. Em *Ensifer* (*Sinorhizobium* – *Rhizobium*) *meliloti* e *Azorhizobium caulinodans* este controle envolve dois níveis, o sistema regulatório de dois componentes, FixL/FixJ, e NifA. A proteína FixL, uma heme-proteína quinase oxigênio sensitiva, é autofosforilada na ausência de O₂ e fosforila FixJ, o qual, por sua vez, ativa a transcrição de outras proteínas regulatórias, como FixK e NifA (DAVID et al., 1988).

No gênero *Bradyrhizobium*, os genes envolvidos no evento de nodulação (genes *nod*), fixação do nitrogênio (genes *fix*) e síntese de nitrogenase (genes *nif*) estão localizados no cromossomo (DESHMANE & STACEY, 1989). Anteriormente, achava-se que o controle dos genes de fixação baseado no metabolismo

microaeróbio era limitado ao sistema NifA, o qual se auto-ativava pela percepção de baixa tensão de oxigênio (THÖNY et al., 1989). Contudo, sabe-se que este processo de ativação é bem mais complexo, envolvendo conjuntos gênicos específicos que se integram no controle final da regulação gênica da nitrogenase. A distinção entre estes sistemas de ativação se dá na percepção e sensibilidade à concentração de oxigênio no interior do nódulo radicular.

Em *B. japonicum* a cascata regulatória FixLJ-FixK₂ é ativada em torno de 5% de oxigênio na forma gasosa (NELLEN-ANTHAMATTEN et al., 1998; SCIOTTI et al., 2003; HAUSER et al., 2006). Entre os genes induzidos temos o operon *fixNOQP* que codifica a *cbb₃*-citocromo oxidase simbiótica, com alta afinidade a oxigênio, que permite ao *B. japonicum* respirar em ambiente com pouco oxigênio. Para este metabolismo específico, FixLJ-FixK₂ necessita de um fator transcricional adicional que pode ser NneR, FixK₁, ou RpoN₁ (MESA et al., 2003).

Outra cascata regulatória RegSR-NifA induz os genes *nif* responsáveis pelo complexo nitrogenase. O sistema RegSR parece não responder diretamente ao oxigênio, mas indiretamente para ativação de eventos fisiológicos não elucidados em *B. japonicum*. A ativação dos genes *nif* pela proteína NifA requer uma concentração de oxigênio menor que 0.5% (SCIOTTI et al., 2003; HAUSER et al., 2006). Está claro que *B. japonicum* utiliza ferramentas específicas para monitorar e controlar a transição de bactéria de vida-livre, aeróbia, para um bacterióide endossimbionte, em ambiente microaeróbico, assegurando o estabelecimento de um metabolismo para produção de energia e produção da nitrogenase (HAUSER et al., 2006).

4. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

Mudanças celulares relativas à sobrevivência, crescimento e diferenciação refletem em alterações nos padrões da expressão gênica e a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos sempre foi fundamental para qualquer investigação de funções gênicas (ZAMORANO et al., 1996).

No início dos anos 80, Kary Mullis e colaboradores desenvolveram a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que foi uma revolução nos estudos com

ácidos nucléicos. Mas, como uma técnica analítica, o método original de PCR apresenta sérias limitações. Por amplificar primeiro a sequência de DNA e só em seguida analisar o produto, a quantificação torna-se extremamente difícil, pois nesta análise, as bandas no gel de agarose são quantificadas por algum método densitométrico, não apresentando resultados totalmente confiáveis. Posteriormente, Higuchi et al. (1992) adaptaram esta técnica e desenvolveram a mais poderosa ferramenta de análise quantitativa de ácidos nucléicos, a técnica de PCR quantitativo em tempo real. Esta nova tecnologia beneficiou grandemente as áreas médica/diagnóstica, agropecuária e científica de modo geral. A PCR quantitativo em tempo real tem sido usado para detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), análises de aberrações cromossômicas e mais recentemente detecção indireta de proteínas baseada em transcritos com grande precisão (KUBISTA et al., 2006).

Este sistema é baseado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, enquanto ocorre a amplificação. Para isso, utilizam-se oligonucleotídeos e sondas específicas ou ainda fluoróforos intercalantes de dupla-fita, que emitem fluorescência a cada hibridização e a cada passo de amplificação (KUBISTA et al., 2006). O sinal fluorescente é detectado após cada ciclo da PCR, durante a fase exponencial. O dobro da quantidade do produto é acumulado a cada ciclo, assumindo 100 % de eficiência da reação. O sinal aumenta de uma forma diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR na reação, enquanto a cinética de amplificação permite monitorar o acúmulo do produto em tempo real especificamente durante a fase log-linear da reação. Estas características fazem com que a PCR quantitativa em tempo real seja considerada a técnica mais precisa e reprodutível técnica para a quantificação gênica que existe no momento (KUBISTA et al., 2006).

Como ferramenta de pesquisa, esta tecnologia consiste em um procedimento rápido e preciso para acessar informações concernentes a mudanças na expressão gênica, como resultado de alterações fisiológicas ou desenvolvimental. O método de quantificação em tempo real denominado quantificação relativa (qrPCR) mede

mudanças nos níveis de um gene candidato de interesse, em relação aos níveis normais de um gene controle invariável. Genes “housekeeping”, cuja expressão não deve mudar sob condições experimentais diferentes, servem como padrões internos convenientes, denominados controles endógenos (VALASEK & REPA, 2005).

Embora empregada como método independente e suficiente para análise de expressão gênica diferencial, a qPCR tornou-se requerida para validação de dados de microarranjos de DNA. A validação destes dados torna-se cada vez mais necessária e criteriosa, uma vez que além do grande volume de dados obtidos, os mesmos são analisados de forma integrada, fornecendo padrões globais de transcriptoma para determinados sistemas biológicos. A ferramenta de PCR quantitativa em tempo real surgiu como uma tecnologia eficiente para validação de dados de arranjos devido a algumas características como, quantificação, rapidez e economia de RNA, utilizando até 1.000 vezes menos RNA que nos ensaios convencionais (RAJEEVAN et al., 2001).

Baseados nos dados iniciais de Souza (2006) obtidos por microarranjos de DNA e frente às vantagens oferecidas pela técnica de qPCR, a mesma foi selecionada como ferramenta para ampliar os estudos de expressão gênica relacionada ao metabolismo respiratório e FBN em *B. elkanii*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor dos kits ou reagentes, foram baseados em Sambrook & Russell (2001). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

Parte I – Análises Bioquímicas e Fisiológicas das culturas *in vitro* de *Bradyrhizobium elkanii*, inoculantes comerciais e bacterióides

1. Descrição das amostras experimentais e suas finalidades

a) Amostras para teste de restrição de oxigênio

Para os testes de restrição de oxigênio para análise da cinética respiratória de células de *B. elkanii*, um pré-inóculo foi preparado em meio TY (“Tryptone-Yeast Medium”) (BERINGER, 1974) durante 48 horas a 28°C, sob agitação a 140 rpm (90 unidades KLETT). Inóculos foram preparados em meio líquido a partir de 1% do pré-inóculo cultivado. Os inóculos foram cultivados em três condições respiratórias diferentes: aerobiose, microaerobiose e anaerobiose.

b) Inoculantes comerciais

Os inoculantes comerciais para soja Biorhizo10[®] (Bioarts), foram utilizados nos testes bioquímicos, fisiológicos e análise de expressão. Estes compostos por *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. elkanii* SEMIA 587, foram acondicionados sob condições recomendadas pelo fabricante e suas idades correspondiam a 12, 27 e 48 meses desde a data de fabricação.

c) Bacterióides

Para teste de eficiência de nodulação, foram inoculadas em sementes de soja inoculantes comerciais compostos pelas estirpes *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 com 12, 27 ou 48 meses de fabricação, conforme recomendado pelo fabricante. Bacterióides foram isolados 35 dias após o plantio para testes posteriores.

d) Manutenção da estirpe de *B. elkanii*

Para manutenção da estirpe SEMIA 587 de *B. elkanii* em placas de cultura, foi utilizado o meio YMA (“Yeast Mannitol Agar”) (VINCENT, 1970), mantido em BOD a 28°C.

2. Cultivo *in vitro* de *B. elkanii* sob diferentes condições de aeração

a) Experimento de restrição de Oxigênio

Inóculos foram preparados em erlenmeyers de 250 ml contendo 150 ml de meio “Tryptone-Yeast Extract Medium” (TY) inoculado com 1% de suspensão de células a partir de um pré-inóculo incubado por 48h sob agitação de 140 rpm e 28°C. Cada nova cultura foi mantida a temperatura de 28°C em agitador a 140 rpm., variando-se o tempo de incubação: 24 horas ou 48 horas. As culturas foram submetidas a diferentes atmosferas com diferentes concentrações de oxigênio: 1) uma atmosfera de cultivo padrão para a bactéria; 2) uma atmosfera microaerofílica, em jarras de anaerobiose (FIG. 2), obtida por meio de uma mistura de gases constituída de 80% de N₂, 15% de CO₂ e 5% de O₂; 3) uma atmosfera considerada anaerofílica, obtida por uma mistura de gases constituída de 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂. Após o período de cultivo, as amostras foram analisadas quanto a pH, densidade óptica a 600 nm (DO 600 nm), determinação do número de células por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e processadas para análise da redução de INT em INT-Formazan. Alíquotas de cada amostra também foram preparadas para extração de RNA, para posteriores análises de expressão através da técnica de quantificação relativa por PCR quantitativo em tempo real (qrPCR).



Figura 2: Jarra de anaerobiose. **A** – Detalhe da válvula de controle para retirada dos gases através de vácuo e introdução das misturas gasosas.

b) Ensaio Respiratório pela redução de INT

As culturas crescidas sob variações de concentração de oxigênio e os inoculantes acima descrito, foram submetidas a um ensaio bioquímico de redução de INT (2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium) em INT-Formazan para verificação da taxa respiratória como descrito por Zimmermann (1978), Trevors (1984) e Rodrigues (1992). Alíquotas de cinco mililitros provenientes das culturas acima descritas foram incubadas por 2 horas, a 28°C sob agitação de 200 rpm, protegidas da luz, com uma solução de INT 4mg/ml. Após este período, procedeu-se a extração do INT-Formazan acumulado intracelularmente. Dois mililitros da mistura foram submetidos à extração do INT-Formazan com a adição de 5ml de etanol absoluto. Esta mistura foi agitada vigorosamente durante 1 minuto em agitador de tubos tipo vórtex. Logo após, este extrato etanólico foi filtrado em membrana de 0,45 µm e realizado a leitura espectrofotométrica do filtrado etanólico em uma densidade óptica de 480 nm. O restante do material contendo a suspensão celular foi fixado com 30 µl de formaldeído 37% para posterior análise de microscopia óptica de contraste de fase.

c. Análises Microscópicas

As alíquotas fixadas em formaldeído ao final do processo de redução de INT foram utilizadas para análises em microscopia óptica. Uma gota do material fixado e marcado pelo INT foi colocada em lâminas de vidro para microscopia e cobertas com uma lamínula. Para observação também foi utilizado óleo de imersão. A observação foi realizada em um aumento de 100x na objetiva PH3 em um microscópio ótico DMLB (Leica) acoplado a um sistema de aquisição de imagens modelo MPS60 (Leica), que consiste de uma câmera fotográfica. O filme fotográfico utilizado foi Fuji ASA 400. A captura de imagens foi realizada em sistema de campo claro e contraste de fase objetivando o registro dos “spots” oriundos do acúmulo intracelular de INT-Formazan.

3. Análise das características dos Inoculantes

Os inoculantes descritos no Item 1b., foram analisados quanto à densidade óptica através da leitura de absorvância a 600 nm em Biofotômetro (Eppendorf). O pH também foi registrado em pHmetro (Analyser pH 300). Na data da inoculação das sementes de soja, amostras dos inoculantes foram plaqueadas em meio YMA para se proceder à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para a contagem de UFC foram retirados 100 µl do inoculante e adicionados a um microtubo contendo 900 µl de água estéril. Homogeneizou-se a suspensão através de 05 pipetagens sucessivas, originando uma solução com concentração de diluição 10^{-1} . Em seguida, foram retirados 100 µl da solução 10^{-1} e misturados com 900 µl de água estéril, seguindo o procedimento descrito anteriormente, originando a diluição 10^{-2} . O processo de diluição foi realizado sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-7} . Alíquotas de 100 µl das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram distribuídos em placas de Petri contendo meio YMA. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a inoculação, as placas foram mantidas invertidas em uma B.O.D. a 28°C durante 6 (seis) dias, quando se efetuou a contagem das UFC para o cálculo do número de célula/ml, pela formula $n^{\circ} \text{ de células/ml} = n^{\circ} \text{ UFC} \times \text{Fator de Diluição} \times 10$.

4. Ensaios de Nodulação

a) Inoculação das Plantas

Sementes de soja, cultivar M-SOY 8000RR, foram desinfestadas pela ação de etanol 95%, durante 1 minuto, e água sanitária 1,5% por 6 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, seis a sete vezes por 1 minuto cada, as sementes foram embebidas em uma suspensão bacteriana contendo células de *B. elkanii* e *B. japonicum* provenientes dos inoculantes, acima descrito. A dosagem para inoculação das sementes utilizada foi 200 ml / 50 kg de semente, sendo recomendado pelo fabricante 100 a 300 ml / 50 kg de sementes. As sementes permaneceram incubadas nesta suspensão por cerca de 10 minutos, quando foram então semeadas em vasos plásticos (tubetes) de 300 ml, contendo vermiculita esterilizada como substrato de plantio. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunhas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, entre os meses de fevereiro/março (2008) e dezembro/janeiro (2009), durante 35 dias contados do plantio. Após esta data as plantas foram processadas para contagem do número de nódulos e extração de RNA dos bacterióides simbiotes.

b) Isolamento de Bacterióides

O isolamento de bacterióides dos nódulos foi efetuado conforme metodologia descrita por Chohan e Copeland (1998), na presença de 250 mM de manitol como osmoprotetor, utilizando o tampão composto por 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 50 mM KCl. Os bacterióides foram obtidos de nódulos maduros, correspondendo à aproximadamente 35 dias após plantio/inoculação. A extração de RNA procedeu-se com 0,6 gr. de nódulo por amostra.

Parte II – Análises da expressão gênica das culturas *in vitro* de *Bradyrhizobium elkanii*, inoculantes comerciais e bacterióides por PCR quantitativo em tempo real

1. Extração de RNA total de bactérias e bacterióides

As células provenientes dos diferentes ensaios (1,5 ml por amostra) foram lisadas com 100 µl de solução contendo SDS 1,4%, EDTA 4 mM e lisozima 3 mg/ml, durante 10 min a 37°C. Após a lise das células, foi dado prosseguimento às extrações com Trizol (Invitrogen) adicionando 800 µl deste reagente e agitando-se por 1 minuto vigorosamente em agitador de tubos. O próximo passo foi a adição de 200 µl de clorofórmio, seguido de uma centrifugação a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C, conforme descrito pelo fornecedor. Após a recuperação da fase superior, a precipitação do RNA foi com 1 volume de isopropanol, procedendo-se à lavagem do pelete com 500 µl de etanol 75%. O RNA foi ressuspendido em água isenta de ribonucleases. A avaliação da qualidade do RNA isolado foi através de eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante, contendo 18% (v:v) de formaldeído 37% em tampão MOPS/Acetato/EDTA 1x concentrado. Amostras que apresentaram contaminação por DNA foram tratadas com DNase I sendo 1 µl para cada 1 µg de RNA incubados por 15 min. a 37 °C e precipitadas novamente com etanol.

2. Análise da Expressão Gênica por PCR quantitativo em tempo real

a) Síntese de cDNA

Para obtenção dos cDNAs, 2 µg de RNA total de cada amostra (bactérias cultivadas sobre diferentes condições de oxigênio, inoculantes e bacterióides), foram misturados a 40 U de RNAsin (Promega), inibidor de RNase; 1,5 µg de “random hexamer primers” pd(N)₆ (Amershan Bioscience) e água isenta de ribonucleases q.s.p. 10 µl. A mistura permaneceu incubada a 70 °C por 5 min, sendo rapidamente resfriada a 4°C. A esta mistura foi adicionado 4 µl de tampão de reação [5x] (Promega), 2,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTP mix 5 mM e 1 µl da transcriptase reversa ImProm II (Promega), completando reações de 20 µl. A síntese do cDNA foi efetuada a 40°C durante 1:30 hs. Após a síntese as amostras foram estocadas a -20°C para posterior utilização.

b) Descrição dos genes alvos e do controle endógeno utilizados na quantificação relativa de transcritos

Foram selecionados sete genes relacionados ao metabolismo respiratório e fixação biológica do nitrogênio para análise. As sequências FASTA foram obtidas do banco interno do LBMP (<http://lbmp.fcav.unesp.br>) ou do RhizoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase>), contendo sequências genômicas de *B. elkanii* e *B. japonicum*. Após a escolha dos genes alvos, as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram desenhadas utilizando-se o programa *Primer Express 3.0*. As sequências para cada primer estão ilustrados na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de qPCR

		<i>T_m</i> °C	<i>Amplicon pb</i>
<i>fixJ</i>	Forward 5'CATGCCGGGCCTTGAC3'	55	54
	Reverse 5' GCTTTGCTGCGCCTTCAT3'	56,1	
<i>fixK₂</i>	Forward: 5'ACCCAAATCGGTGGCAAGA3'	57,3	62
	Reverse: 5'CGTGATCGCACCGAACTG3'	55,4	
<i>fixL</i>	Forward: 5'TCGGCCAGAACGTCAACA3'	55,4	68
	Reverse 5'AACGCGAAATGTAGCTGTCATG3'	56,6	
<i>fixN</i>	Forward: 5' TGGTGGTACGGCCATAACG3'	56,3	78
	Reverse: 5'GCTTCGGGATGAAGTAGTACATGA3'	56,1	
<i>nifA</i>	Forward: 5'TGCCGACCGGGAGGTT3'	56,6	53
	Reverse: 5'CCGATGAACGATACCGGTAT3'	53,6	
<i>nifH</i>	Forward: 5'TCGGAGAAATGATGGCAAT3'	52,5	57
	Reverse: 5'CGTATTTTCAGGATGCCTTTGGA3'	57,6	
<i>rpoN₁</i>	Forward: 5'CGGCCGCTGAATCTAAAGG3'	57	54
	Reverse: 5'GCGACACCGTGGATTCATG3'	56,7	
<i>sigA</i>	Forward: 5'AGGCGAAGGACAAGGAAAAAG3'	56,2	65
	Reverse: 5'GGCGCGTCCTGGGAAT3'	56,2	

O fator σA (fator sigma primário da RNA polimerase) foi utilizado como controle endógeno, uma vez que a expressão deste gene constitutivo mostra-se

praticamente invariável, servindo de padrão normalizador para análise comparativa das variações de expressão dos outros genes. O sistema SYBR Green foi usado como repórter nas análises de qPCR.

c) Quantificação Relativa da expressão gênica

Para quantificação relativa foram utilizados 1 µl de cDNA sintetizado nas condições descritas anteriormente (item 2a), 800 nM de cada primer (Forward e Reverse) para cada gene a ser estudado, 12.5 µL de PCR Master Mix SYBR Green [2x] (Applied Biosystems) e água isenta de nucleases q.s.p. 25 µl. O experimento de quantificação relativa foi executado em placas ópticas e conduzido em um aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems), seguindo as condições térmicas de ciclagem automaticamente determinadas pelo equipamento: 1) 2 minutos / 40 °C (ativação da AmpErase UNG); 2) 10 minutos / 95 °C (ativação da AmpliTaq Gold DNA polimerase); 3) 40 ciclos de 15 segundos / 95 °C (dissociação) e 1 minuto / 60 °C (anelamento / extensão e captação da fluorescência).

d) Análise dos Dados

A análise dos dados gerados e a quantificação relativa dos níveis de expressão dos genes foram executadas através do programa *RQ Study* (Applied Biosystems). O programa utiliza o método comparativo do Ct (“threshold cycle”) de quantificação relativa, calculando automaticamente o quanto houve de variação na expressão do gene alvo em relação ao controle endógeno. Este método baseia-se no algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que gera o valor da expressão do gene alvo, normalizada pelo controle endógeno (“ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2”). O ΔCt consiste no valor do Ct do alvo, menos (-) o valor do Ct do controle endógeno. De posse dos valores de ΔCt , calcula-se o $\Delta\Delta Ct$, que é o ΔCt da amostra a ser analisada (situações experimentais) menos (-) o ΔCt do calibrador (amostra de referência) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para o bom funcionamento desse método, um gene deve ser usado como controle endógeno. Este deve ser um gene cuja expressão não varia ou é pouco variável (genes “housekeeping”, por exemplo).

Outra escolha importantíssima para aumentar a fidedignidade da análise é a escolha do calibrador. Uma vez que os dados do alvo foram normalizados em relação ao controle endógeno, precisamos analisar a variação existente entre cada amostra em relação a este calibrador. Este geralmente é uma situação controle ou amostra não tratada. A condição de crescimento aeróbica 24h de cultivo foi escolhida para calibrador das taxas de expressão dos genes simbióticos nas diferentes condições observadas. O ajuste da linha de base e do “threshold” foram automaticamente determinados pelo programa.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I: Análises bioquímicas e fisiológicas para os diferentes cultivos de *B. elkanii*, isoladamente

1. Determinação do número de células, pH e DO a 600 nm

As análises de densidade óptica (DO) das amostras foram realizadas em biofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm e apresentaram os seguintes valores de DO: 0,208 em 24h e 1,156 em 48h para amostras aeróbicas; 0,171 em 24h e 1,459 em 48h para amostras microaeróbicas; e finalmente, 0,181 em 24h e 1,606 em 48h para amostras anaeróbicas (FIG.3).

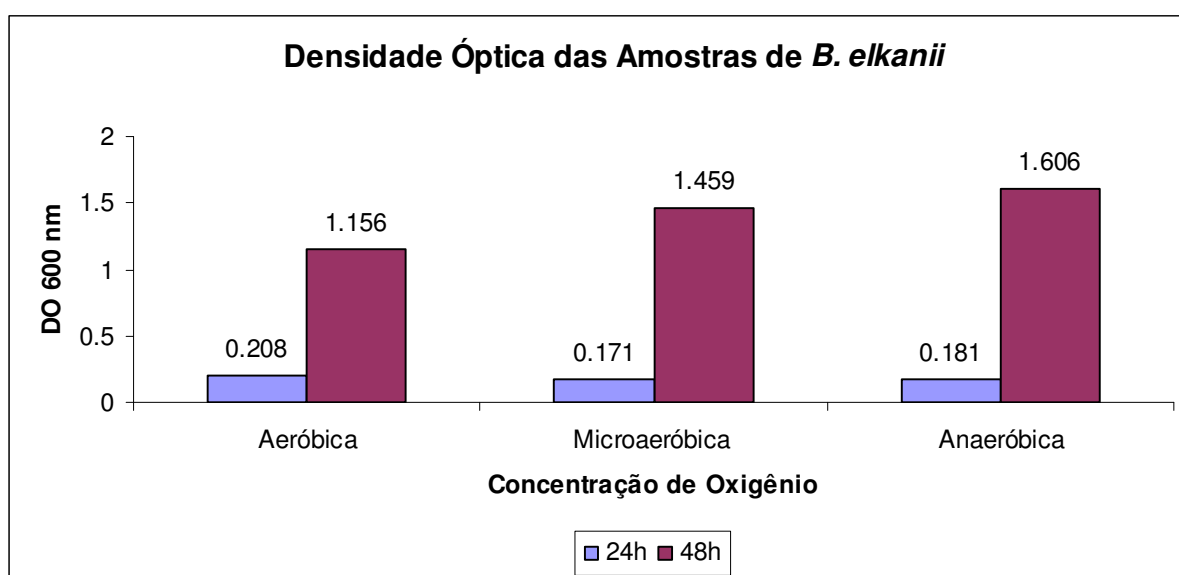


Figura 3: Análise da densidade óptica, através da absorbância a 600 nm em biofotômetro, do crescimento das amostras cultivadas em diferentes atmosferas gasosas e em diferentes tempos de cultivo.

Um pequeno decréscimo na densidade ótica foi observado para 24h quando aeróbico foi comparado com microaeróbico e anaeróbico. Entretanto, em 48h observou-se um aumento da densidade ótica quando se realiza a mesma

comparação, fato este que pode ser atribuído a uma adaptação da bactéria ao ambiente quando cultivada por 48 horas.

Todas as culturas acima citadas foram submetidas à contagem do número de células através da técnica de diluição seriada, sendo obtido os números de UFC. As diluições foram realizadas em triplicatas para 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} . Os resultados das contagens e os valores de pH de cada cultura, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Contagem das células viáveis e pH das culturas de *B. elkanii*.

	<i>Aeróbico</i> <i>24h</i>	<i>Aeróbico</i> <i>48h</i>	<i>Microaero</i> <i>24 h</i>	<i>Microaero</i> <i>48h</i>	<i>Anaeróbico</i> <i>24h</i>	<i>Anaeróbico</i> <i>48h</i>
<i>(cels/ml)</i>	$1,0 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{11}$	$6,9 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{11}$	$6,4 \times 10^{11}$
<i>pH*</i>	7,14	7,29	6,66	6,78	6,8	6,9

*Meio TY utilizado como branco (pH = 6,85)

A contagem do número de células / ml corrobora os dados obtidos para análise de densidade ótica, inclusive no que diz respeito ao crescimento e adaptação ao ambiente com pouco ou nenhum oxigênio em 48 horas, principalmente.

As amostras aeróbicas apresentaram um leve aumento de pH. Rizóbios de crescimento lento como *Bradyrhizobium* tendem a alcalinizar o meio de cultura, enquanto os que de crescimento rápido geralmente acidificam o meio fato observado no cultivo aeróbico 24 e 48 h. TAN & BROUGHTON (1981), sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido seguida de excreção de ácidos orgânicos e de compostos de nitrogênio pelas estirpes de crescimento lento e consequente liberação de cátions. Ao contrário do esperado, as estirpes produtoras de ácido em meio de cultura não são mais tolerantes à acidez do solo (NORRIS, 1965). O crescimento rápido parece conferir certa vantagem competitiva na rizosfera devido à maior competição com outros microrganismos. Em condições de redução de oxigênio, ocorreu uma pequena queda para microaeróbico e manteve-se para anaeróbico podendo ter sido provocada pela formação de compostos durante o cultivo nessas atmosferas gasosas.

2. Ensaio bioquímico de atividade respiratória através da redução de INT a INT-Formazan dos experimentos de restrição de oxigênio

O sistema de transporte de elétrons (ETS) é um componente comum em bactérias, permitindo, através do processo respiratório, a produção de energia na forma de ATP. O sistema ETS reduz 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium (INT) à INT-Formazan, uma vez que INT compete diretamente com o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons. Métodos bioquímicos, como a determinação da atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS) têm sido empregados para a dosagem do consumo de oxigênio. Baseado neste processo de redução, as bactérias que estão respirando acumulam intracelularmente INT-Formazan, tornando-se um método eficiente para analisar a viabilidade de células em diferentes condições (ZIMMERMANN, 1978; MAURICE et al., 2001). Após consolidado este processo, dosagens das taxas de acúmulo de INT-Formazan podem ser realizadas através de espectrofotometria e também através de microscopia para verificação dos “spots” intracelulares de INT-Formazan.

Análises espectrofotométricas dos ensaios realizadas a 480 nm, apresentaram valores de DO de: amostras aeróbicas 0,168 em 24h e 0,189 em 48h; para microaerobiose, 0,036 em 24h e 0,093 em 48h; e, finalmente, para culturas crescidas na ausência de oxigênio 0,025 em 24h e de 0,174 em 48h (FIG.4)

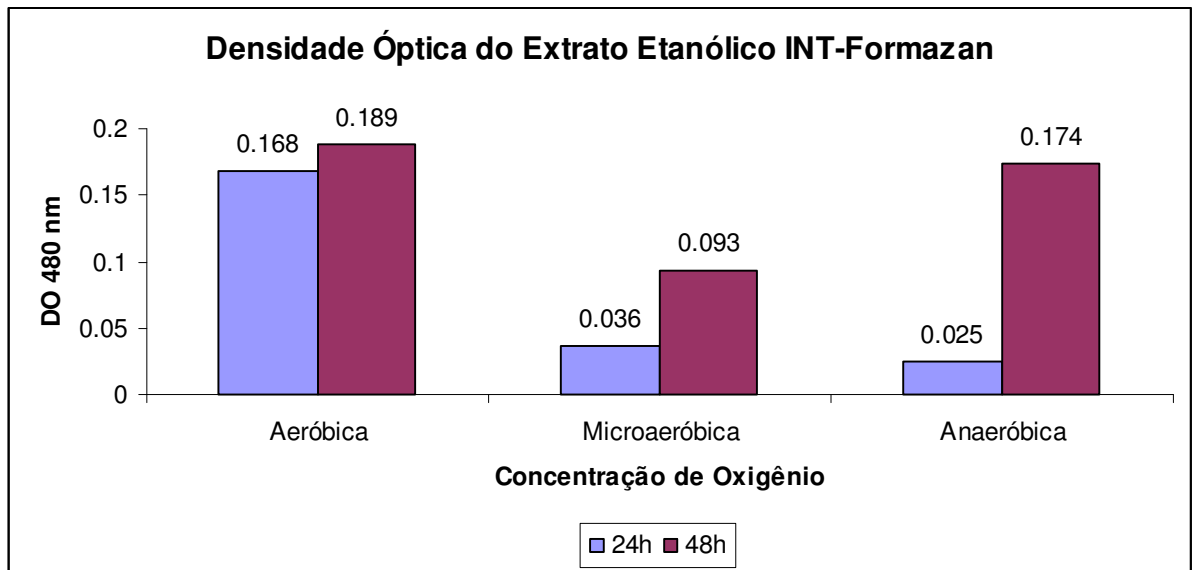


Figura 4: Análise da densidade óptica a 480 nm do extrato etanólico proveniente das culturas em diferentes atmosferas gasosas e em diferentes tempos de cultivo.

À medida que decresceu a concentração de oxigênio, decresceram as taxas respiratórias quando analisados os extratos etanólicos das diferentes culturas, exceto em cultivo anaeróbico por 48 horas. O maior decréscimo foi observado principalmente entre os ambientes aeróbicos e microaeróbico, representando uma queda de 77,5% da DO nas 24h de cultivo e 49% nas 48h de cultivo. Porém, quando comparada as taxas respiratórias microaeróbicas com anaeróbicas, o decréscimo foi mais sutil em 24h, correspondendo a 28%, enquanto um aumento significativo em 48h foi observado. Este aumento na densidade óptica do cultivo anaeróbico correspondeu a quase 100%, atingindo níveis próximos ao gerado pela cultura crescida aerobicamente.

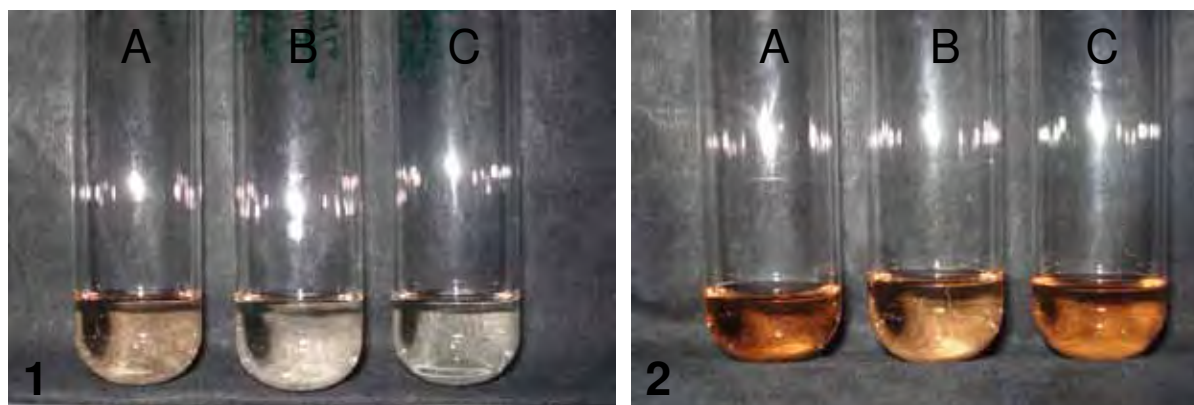


Figura 5: Extratos etanólicos INT-Formazan (Dados representativos). 1) culturas crescidas durante 24h e 2) 48h. A – Aeróbico, B - Microaeróbico e C – Anaeróbico

A análise visual destes extratos permite-nos aferir uma mudança na coloração das mesmas, corroborando com os dados obtidos pela absorvância espectrofotométrica. Há de se evidenciar na imagem 1 (FIG. 5) a diminuição gradativa da intensidade da coloração da amostra aeróbica (A) até a anaeróbica (C); enquanto na imagem 2, esta diminuição se verifica apenas na passagem de aeróbico (A) para microaeróbico (B), voltando a aumentar no anaeróbico (C). Este último aumento na intensidade do extrato etanólico representou níveis aproximados do tubo A, referente à cultura aeróbica. É importante ressaltar que cada cultivo e análise foi realizado de forma independente, e os dados são comparativos entre eles.

Em bradirrizóbios, uma alta flexibilidade fisiológica é exigida para sobrevivência em condições variáveis como a passagem da bactéria de vida livre para a forma de endossimbionte. Entre as mudanças esta a expressão do citocromo cbb_3 oxidase terminal (FixNOPQ) com alta afinidade por oxigênio, portanto ativa em um ambiente microaerofílico. Neste ambiente microaeróbico, as cascatas dos genes FixLJ-FixK₂ e RegSR-NifA atuam para permitir a percepção dos níveis de oxigênio presente e, conseqüentemente, a ativação dos genes envolvidos no processo da fixação.

Algumas apoproteínas específicas podem se associar com componentes da sub-classe dos tetrapirróis chamados heme, que apresentam importantes funções

incluindo transporte de elétrons (ex. citocromos), ligar e transportar oxigênio (ex. hemoglobina) e catálise oxidativa (ex. peroxidases). O precursor universal dos tetrapirróis é o ácido d-aminolevulínico (ALA), que é sintetizado por diferentes vias dependendo do organismo (BEALE, 1996; JORDAN, 1994). Membros do sub-grupo das α -proteobactérias (incluindo rizóbios) sintetizam ALA via condensação de glicina e succinil CoA pela ALA sintase (via de Shemin). Subsequentemente, o ALA é convertido a proto heme em diversas reações enzimáticas.

Dependendo das condições de oxigênio celular, a descarboxilação oxidativa do coproporfirinogênio III a protoporfirinogênio IX, é catalisada por diferentes enzimas em bactérias aeróbicas facultativas, que usam o oxigênio molecular como um aceptor de elétrons. Na ausência de oxigênio, a reação é catalisada por uma coproporfirinogênio III desidrogenase cuja atividade requer NADP, ATP, Mg^{2+} e L-metionina. Os genes responsáveis por esta atividade são comumente chamados de *hemN*. Algumas dessas vias de ativação podem ser observadas na Figura 6.

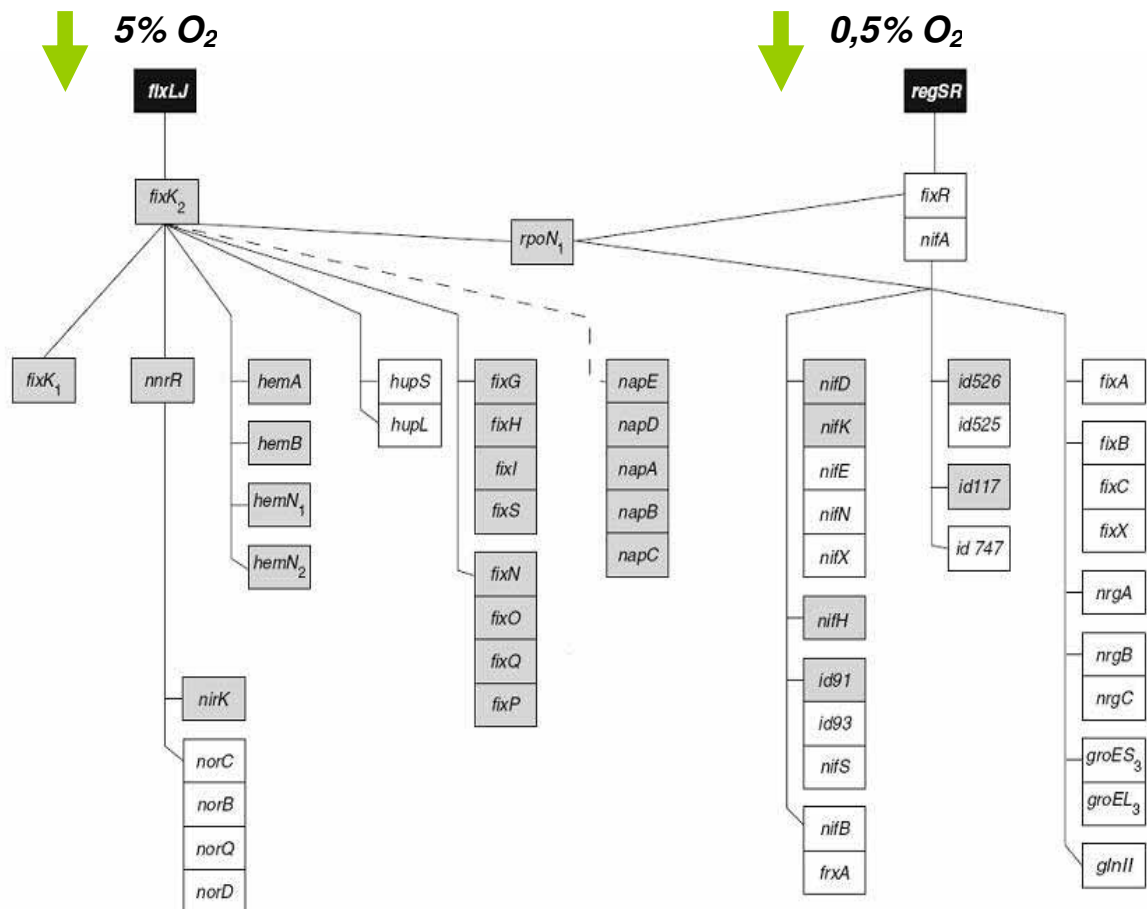


Figura 6: Cascatas regulatórias de ativação gênica em ambientes com baixa tensão de oxigênio (adaptado de Hauser et. al., 2006).

Todas estas reações ocorrem no ambiente simbiótico, ou seja, no nódulo fixador de nitrogênio visto que a bactéria em vida livre não necessita de controle e proteção ao oxigênio. Assim, a restrição de oxigênio utilizada a fim de se obter um ambiente pobre em oxigênio visa entender melhor as vias respiratórias envolvidas neste tipo de metabolismo.

Os dados apresentados neste trabalho permitem afirmar que a baixa concentração de oxigênio (5%) limitou o crescimento das culturas bacterianas negativamente até 24 horas de cultivo, pois em 48 horas, a taxa de crescimento verificada foi maior que a cultura aeróbica (FIG. 3 e TAB. 2). Na dinâmica da cadeia

respiratória, demonstrada aqui com o teste de redução de INT a INT-Formazan (FIG. 4), ocorreu uma redução na taxa respiratória das células em restrição do oxigênio.

Ao analisar a densidade óptica dos cultivos em ausência de oxigênio, verifica-se que o crescimento das mesmas, por 24 horas, foi próximo ao microaeróbico e a densidade óptica para 48 horas um pequeno aumento (FIG. 3). Desta vez, o fato da absorbância da cultura aumentar, ao contrário do que ocorreu com o microaeróbico, a taxa respiratória acompanha este aumento, podendo-se aferir que o microrganismo conseguiu adaptar-se a esta nova condição (FIG. 4). As estratégias utilizadas pelo mesmo para se manter nestas condições, ainda permanecem obscuras, mas em *Bradyrhizobium japonicum*, Fischer e colaboradores (2000) identificaram e caracterizaram um gene *hemN*, chamado *hemN₂*, que é essencial para a biossíntese de proteínas heme. O processo de ativação destas proteínas é dependente da ativação da cascata FixLJ-FixK₂. A utilização de algum aceptor final de elétrons na cadeia respiratória que não o oxigênio é exigido e este deve estar presente no meio rico, ou ser sintetizado durante o metabolismo bacteriano. Assim, o maior número de células em cultivo restritivo de O₂, em 48h, não correspondeu a uma taxa respiratória maior, conforme esperado. Contudo, para explicar o fenômeno de multiplicação celular nestas condições, algumas hipóteses podem ser sugeridas, como: 1) Ativação do mesmo mecanismo observado em bacterióides, pela ativação da citocromo oxidase terminal; 2) Expressão de uma citocromo oxidase alternativa que mantém um fluxo de elétrons para um aceptor final de elétrons de caráter inorgânico; 3) Vias alternativas a partir do Ciclo de Krebs com alto potencial na produção de agentes redutores e ATP; 4) Na ausência de um aceptor final de elétrons, o INT adicionado a fim de marcar a cadeia respiratória, pode ter sido utilizado como aceptor final de elétrons durante o cultivo das mesmas quando este reagente foi adicionado, momento no qual, a cultura deixou o cultivo restritivo de oxigênio (incubação durante 2h), gerando assim, as taxas respiratórias elevadas observadas no extrato etanólico para cultivo anaeróbico durante 48h. Respostas referentes a estas alterações foram buscadas com o estudo molecular dos genes envolvidos neste processo.

3. Análises Microscópicas

Alíquotas dos materiais provenientes das diferentes condições de cultivo também foram analisadas através de microscopia ótica de contraste de fase.

Quando as culturas aeróbicas foram analisadas, a intensidade de acúmulo de INT-Formazan intracelular é mais evidente em 48 horas (FIG. 7), já que o número de células e o extrato etanólico indica este aumento. A diferença na intensidade dos “spots” fica ainda mais evidente quando são comparadas todas as amostras crescidas 24 horas (FIG. 7A, 8A e 9A) na qual existe um decréscimo comprovado pela análise do extrato etanólico. Algo semelhante ocorre quando analisadas as amostras de 48 horas (FIG. 7B, 8B e 9B), nas quais ocorre queda na intensidade da marcação em células do cultivo aeróbico para o microaeróbico, e depois um aumento nesta intensidade na amostra anaeróbica. Estas informações de intensidade visual são importantes para comparação com os outros métodos de análise como UFC e absorbância das culturas e extratos etanólicos, os quais apontam para a mesma informação de crescimento celular e taxas respiratórias baseadas nos ensaios de redução de INT.

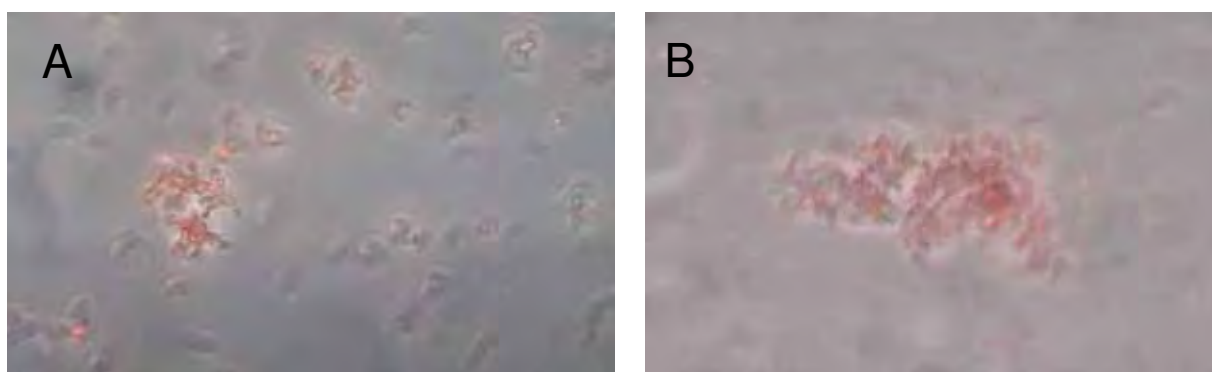


Figura 7: Análise microscópica das amostras da cultura aeróbica fixada com Formaldeído evidenciando o acúmulo intracelular de INT-Formazan. **A** – amostra cultivada por 24h e em **B** – amostra cultivada por 48h (microscopia de contraste de fase)

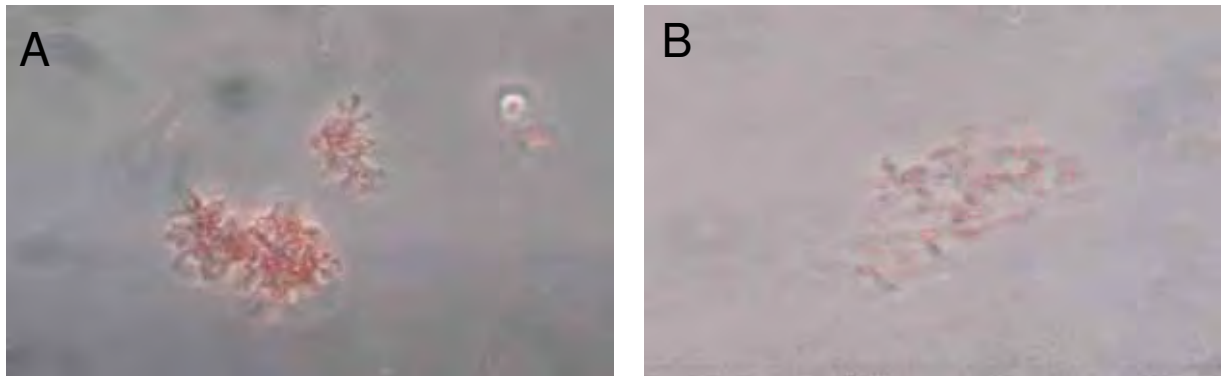


Figura 8: Análise microscópica das amostras da cultura microaeróbica fixada com Formaldeído evidenciando o acúmulo intracelular de INT-Formazan. **A** – amostra cultivada por 24h e em **B** – amostra cultivada por 48h (microscopia de contraste de fase)

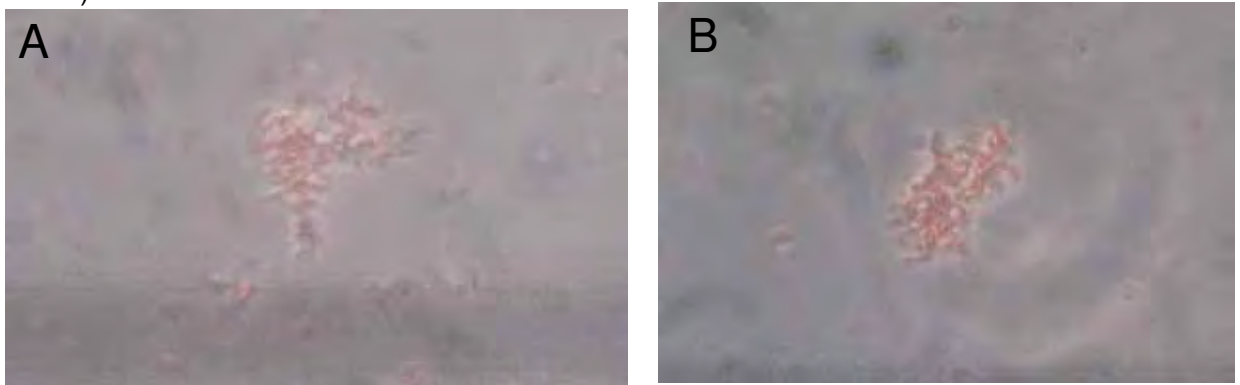


Figura 9: Análise microscópica das amostras anaeróbicas fixada com Formaldeído evidenciando o acúmulo intracelular de INT-Formazan. **A** – amostra cultivada por 24h e em **B** – amostra cultivada por 48h (microscopia de contraste de fase)

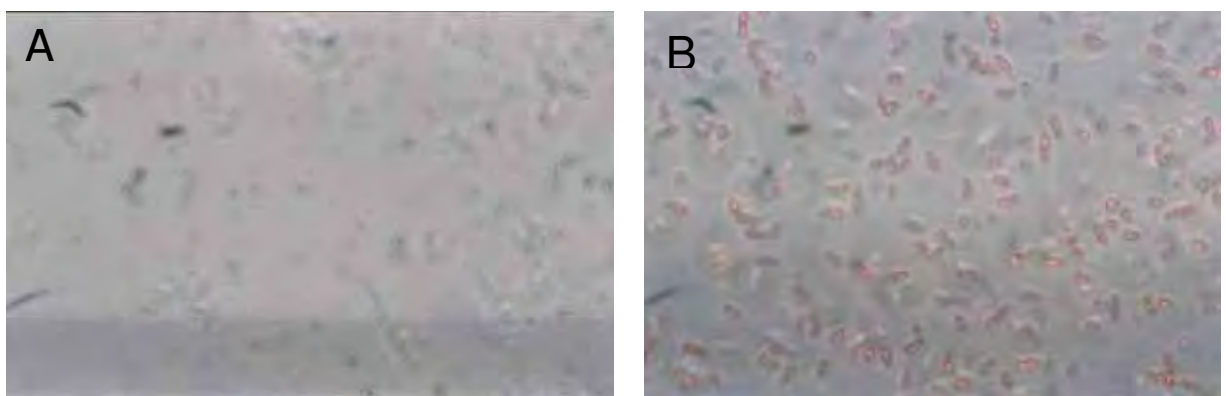


Figura 10: Análise microscópica das amostras fixadas com Formaldeído, evidenciando o acúmulo intracelular de INT-Formazan. **A** – amostra de *B. elkanii* SEMIA 587 sem INT-Formazan e **B** – amostra de *B. elkanii* com acúmulo intracelular característico.

4. Perfil de qualidade do RNA total bacteriano

Uma vez que RNAs íntegros são requeridos para a obtenção de cDNAs eficientes para a quantificação da expressão gênica através de PCR em Tempo Real, o perfil de qualidade (Figura 11 e 12) e rendimento do RNA (Tabela 3) de *B. elkanii* foi verificado durante o crescimento em diferentes concentrações de oxigênio em meio TY. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm estima o grau de pureza do RNA. Esta relação é influenciada pelo pH e concentração de sais da solução na qual o RNA foi diluído. RNAs diluídos em água mantêm uma relação na faixa entre 1,5 e 1,9, enquanto RNAs diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, mantêm a relação entre 1,8 e 2,1 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) Por sua vez, o perfil eletroforético do RNA total íntegro, em gel de agarose, deve mostrar um bandejamento dos RNAs ribossomais 23S e 16S correspondente aos tamanhos 2,9 e 1,5 Kb, respectivamente.

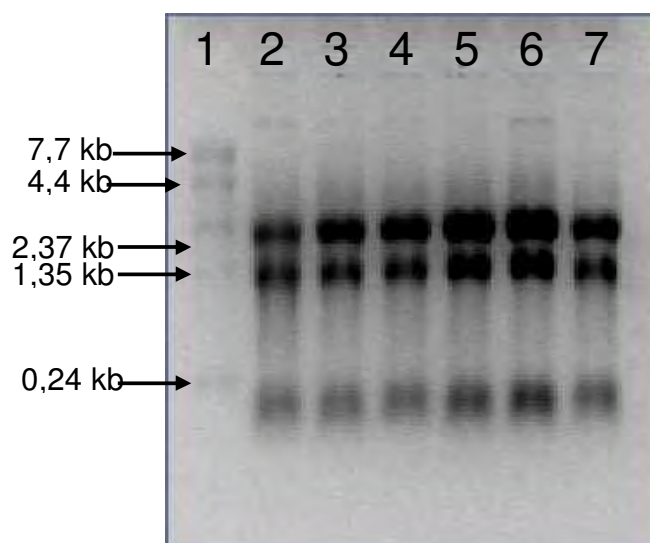


Figura 11: Perfil de qualidade do RNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 cultivada em meio TY, durante **24 horas** em diferentes condições de oxigenação avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante. **1.** Marcador de tamanho molecular (0,24 – 9,4 kb Invitrogen); **2 e 3** amostras crescidas aerobicamente sem restrição de oxigênio; **4 e 5** amostras crescidas em atmosfera de microaerofilia ; **6 e 7** amostras crescidas em anaerobiose.

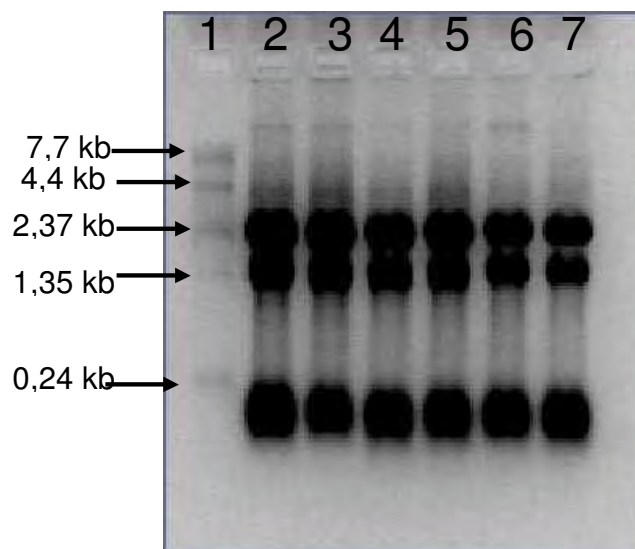


Figura 12: Perfil de qualidade do RNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 cultivada em meio TY, durante **48 horas** em diferentes condições de oxigenação avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante. **1.** Marcador de tamanho molecular (0,24 – 9,4 kb Invitrogen); **2 e 3** amostras crescidas aerobicamente sem restrição de oxigênio; **4 e 5** amostras crescidas em atmosfera de microaerofilia ; **6 e 7** amostras crescidas em anaerobiose.

Tabela 3: Rendimento médio de RNA total obtido de células de *B. elkanii* SEMIA 587, cultivada em meio TY, durante **24 e 48 horas** em diferentes condições de oxigenação

Amostra	Relação 260/280 nm	Rendimento µg/ 25 ml de cultura
Aeróbico 24h	1,60	82
Microaeróbico 24h	1,55	66
Anaeróbico 24h	1,55	92
Aeróbico 48h	1,50	117
Microaeróbico 48h	1,65	113
Anaeróbico 48h	1,55	92

Parte II: Análises bioquímicas e fisiológicas para os inoculantes à base de bradirrizóbios.

1. Análises das características dos inoculantes em diferentes idades.

Assim como descrito anteriormente, os inoculantes utilizados neste ensaio foram submetidos à contagem de células através de diluição seriada para determinação do número de células por mililitro (TAB. 4). As diluições foram realizadas em triplicatas para 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Após seis dias de incubação das placas em B.O.D. as UFC foram contadas.

Tabela 04: Número de células/ml para amostras de inoculantes em diferentes idades

Amostra	Inoculante 12 meses	Inoculante 27 meses	Inoculante 48 meses
Céls/ml	$1,43 \times 10^9$	$3,32 \times 10^9$	4×10^8

O valor mínimo requerido para manutenção do número de células viáveis até o prazo de validade é de 1×10^9 . Os inoculantes de 12 e 27 meses apresentaram número de células viáveis considerado dentro dos padrões das entidades fiscalizadoras de controle de qualidade destes produtos (TAB. 4). O inoculante estocado 27 meses apresentou um número acima do exigido. Sendo assim, verificou-se que estes períodos de estocagem, 12 e 27 meses, não afetaram o número mínimo de células viáveis nesses dois produtos. Por outro lado, o inoculante estocado durante 48 meses apresentou um número de células inferior ao recomendado. Assim, um período extremamente prolongado de estocagem (4 anos) influenciou diretamente o número. Este efeito pode ser devido à exaustão dos nutrientes contidos na formulação, refletindo o número de bactérias encontradas no mesmo. Adicionalmente, o acúmulo de compostos tóxicos originados da morte e degradação celular, por um período prolongado, tendem a inibir o desenvolvimento e manutenção das células viáveis.

Quanto ao pH destes produtos, também foram analisados e podem ser observados na (FIG. 13). O pH registrado para a formulação (formulação comercial

sem inoculação) foi inferior ao encontrado nos inoculantes analisados, uma vez que rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura devida à liberação de compostos nitrogenados oriundos do consumo de açúcares da formulação e, conseqüentemente, liberação de cátions (TAN & BROUGHTON, 1981). Porém, não foram observadas alterações significativas de pH. Maurice et al (2001), relatam um processo de intensas alterações nas propriedades fisiológicas e bioquímicas nas células estocadas a longo prazo com base na relação carbono/nitrogênio/proteínas. Um pequeno decréscimo no pH do inoculante de 48 meses de idade pode ser atribuído ao fato de que a quantidade de células vivas no meio é menor que nos anteriores, assim, a produção dos compostos que alcalinizam o meio se encontrarem em quantidade um pouco menor.

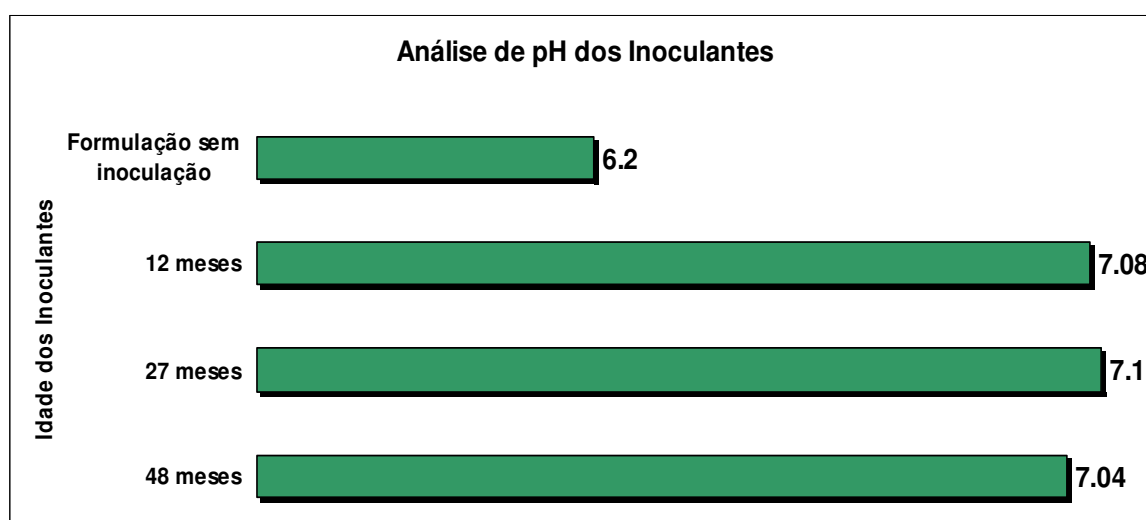


Figura 13: pH dos inoculantes analisados nos ensaios biológicos

Os mesmos inoculantes ainda foram submetidos à análise da densidade óptica em um comprimento de onda de 600 nm em biofotômetro. Um processo de aumento gradual da DO pode ser observado quando os inoculantes são analisados em relação à idade dos mesmos (FIG. 14). Na maior parte das estirpes a quantidade de muco produzida é proporcional ao tempo de crescimento (MARTINS et al., 1997). Quanto maior o período de estoque dos inoculantes maior a produção de

exopolissacarídeos (EPS) produzido pelas bactérias no meio. É possível que o aumento da DO seja reflexo da produção de EPS. Este mesmo efeito também pode ser atribuído ao acúmulo de células mortas. Algumas leituras podem ultrapassar o limite de detecção da absorvância 600 nm.

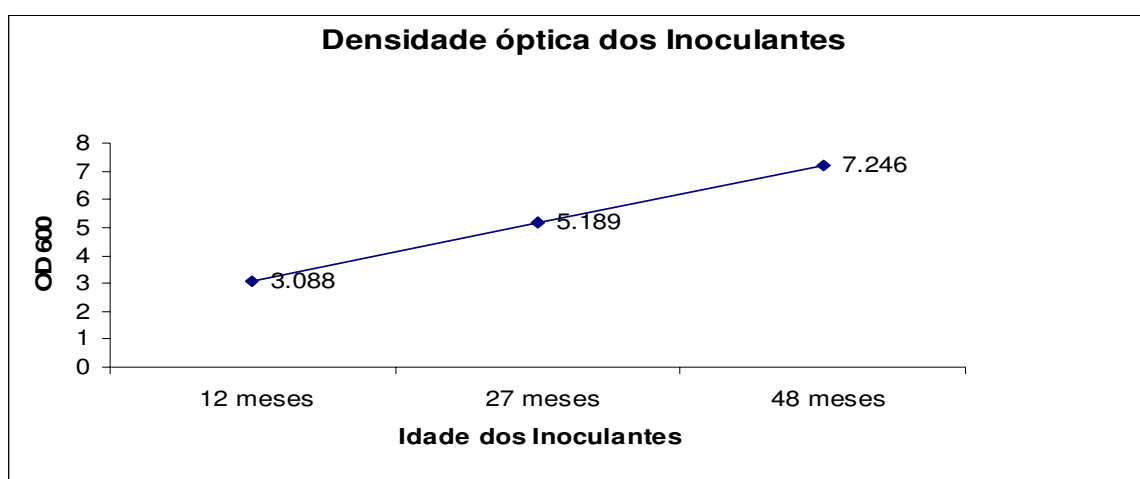


Figura 14: Análise da densidade óptica, através da absorvância a 600 nm em biofotômetro dos inoculantes estocados por diferentes períodos.

2. Ensaio bioquímico da atividade respiratória através da redução de INT a INT-Formazan dos inoculantes

A densidade óptica das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 480 nm de comprimento de onda e apresentaram os seguintes valores: 0,230 para inoculantes 12 meses; 0,411 para inoculantes de 27 meses, e finalmente, 0,121 para inoculantes de 48 meses (FIG.15).

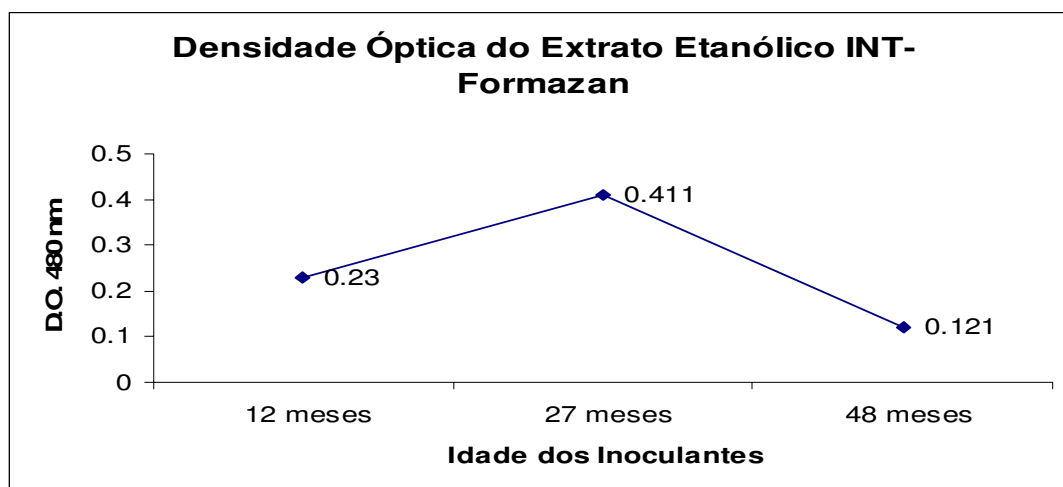


Figura 15: Densidade óptica do extrato etanólico proveniente dos inoculantes em diferentes tempos de estoque.

Os dados obtidos pelo ensaio de redução corroboram os dados obtidos com a contagem de células dos mesmos inoculantes ilustrados na Tabela 4, em que ocorre um aumento de células principalmente no inoculante de 27 meses de idade. Um grande decréscimo na densidade ótica ocorreu em 48 meses, inoculante que apresentou menor número de células. Os mesmos resultados também podem ser observados na análise dos extratos etanólicos na Figura 16.

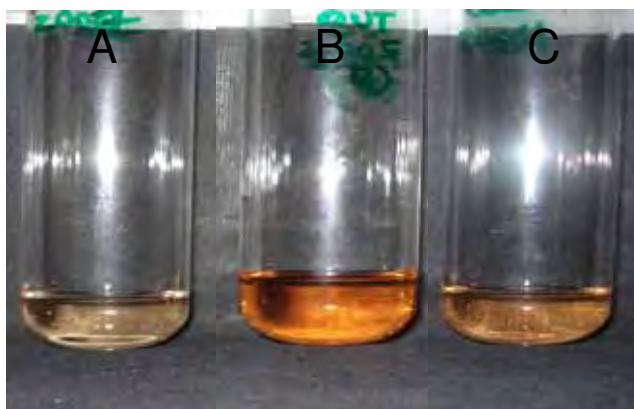


Figura 16: Extratos etanólicos INT-Formazan dos inoculantes estocados por: A) 12 meses, B) 27 meses e C) 48 meses.

Uma vez que o ensaio de redução da cadeia respiratória marca as células que estão respirando, estas acumularam intracelularmente o INT-Formazan que depois foi extraído para obtenção deste extrato. Conforme observou-se, o inoculante de 27 meses foi o que apresentou maior índice respiratório.

3. Experimento de Nodulação com plantas de soja inoculadas com Inoculante líquido comercial

Sementes de soja foram inoculadas com inoculantes comerciais com diferentes idades de fabricação (12 meses, 27 meses e 48 meses de fabricação como descritos anteriormente), conforme instruções do fabricante, visando analisar a eficiência de nodulação após estes períodos de estoque. O processo de nodulação mostrou-se eficiente neste sistema (FIG. 17), provavelmente graças ao estabelecimento de uma população de bradirrizóbios na rizosfera, utilizando a vermiculita como suporte para a formação de biofilmes.

Uma vez estabelecida esta população, bactérias podem migrar para as regiões mais profundas do substrato conduzidas pela água utilizada durante a hidratação. Adicionalmente, exudatos das raízes das plantas, utilizados como nutrientes pelas bactérias, ou como sinais para estabelecimento da simbiose, devem se difundir de forma mais restrita à zona de interação dos pêlos radiculares. Plantas de soja sem inoculação foram utilizadas como controle.

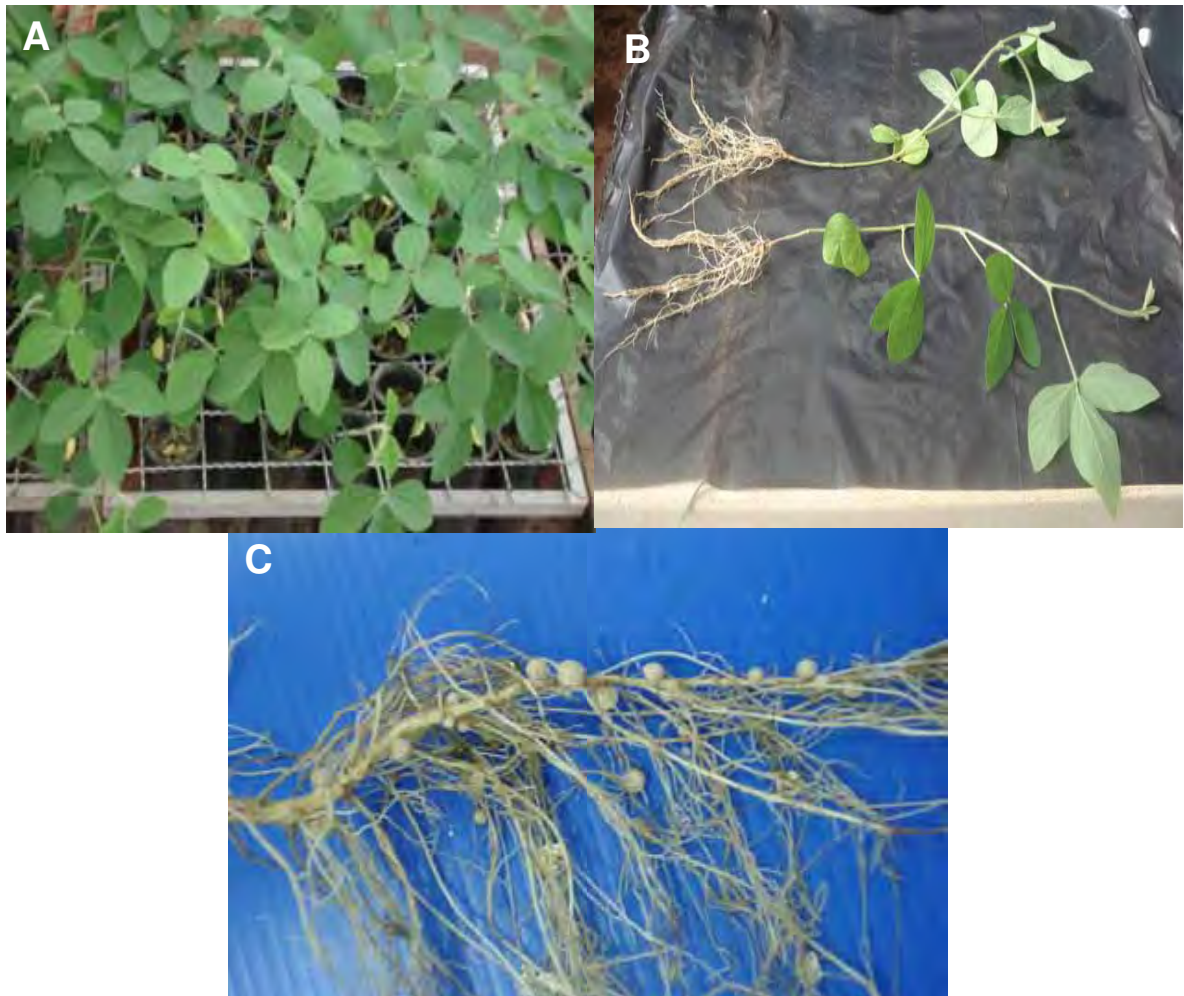


Figura 17: Nodulação de raízes de plantas de soja (*Glycine max*) utilizando inoculantes comerciais. (A) Sistema de plantio em tubetes com vermiculita como substrato (B) Plantas com 35 d.a.p. e (C) Detalhe da nodulação induzida pela inoculação na semente como recomendado pelo fabricante (Inoculação com Inoculante estocado 27 meses)

4. Perfil de qualidade do RNA total isolado dos bradirrízobios presentes nos inoculantes comerciais e de bacterióides isolados de plantas de soja.

Os inoculantes acima descritos foram submetidos à extração de RNA, através do método de Trizol[®]. A Figura 18 ilustra o perfil eletroforético e a Tabela 5 o rendimento médio de RNA provenientes da extração de uma alíquota de 1,5 ml. As maiores concentrações de RNA extraídos foram observadas para o inoculante de 27

meses, decaindo no de 48 meses. Este resultado corrobora os dados obtidos para o número de células por mililitro. As análises indicaram um RNA integro, com bandejamento característico para procariotos, contendo os RNAs 23S e 16S. Para realização de síntese de cDNA e posterior quantificação, um RNA integro é uma pré-requisito.

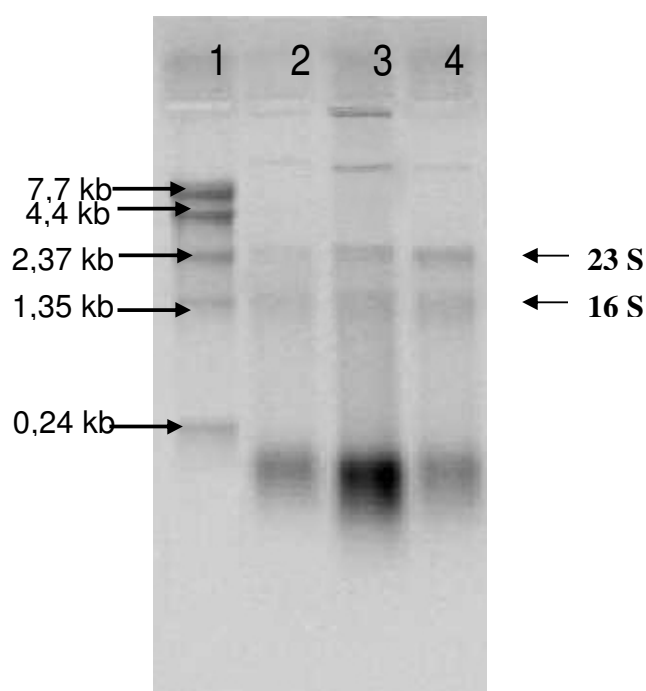


Figura 18: Perfil de qualidade do RNA total de inoculantes avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante. **1** – Marcador de tamanho molecular: 0,24 – 9,4 kb Invitrogen ; **2** RNA inoculante 12 meses, **3** - 27 meses e **4** - 48 meses.

Tabela 5: Rendimento médio de RNA total obtido de células de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 presentes nos inoculantes.

Amostra	Relação 260/280 nm	Rendimento (µg) / 1,5 ml
Inoculante 12 meses	1,6	34
Inoculante 27 meses	1,8	37
Inoculante 48 meses	1,6	24

O perfil de qualidade e o rendimento do RNA de bacterióides provenientes das plantas inoculadas e cultivadas por 35 dias são mostrados na Figura 19 e na Tabela 6, respectivamente.

O número médio de nódulos por planta variou de acordo com o inoculante aplicado, e o rendimento em gramas de nódulo por experimento está destacado na Tabela 6. Após a extração, as amostras de RNA foram estocadas a -80°C em ultra-freezer para posteriores análises de expressão gênica através de PCR quantitativo. As amostras que apresentaram contaminação com DNA foram tratadas com 5 unidades de RQ1 RNase free DNase da Promega conforme protocolo do fabricante.

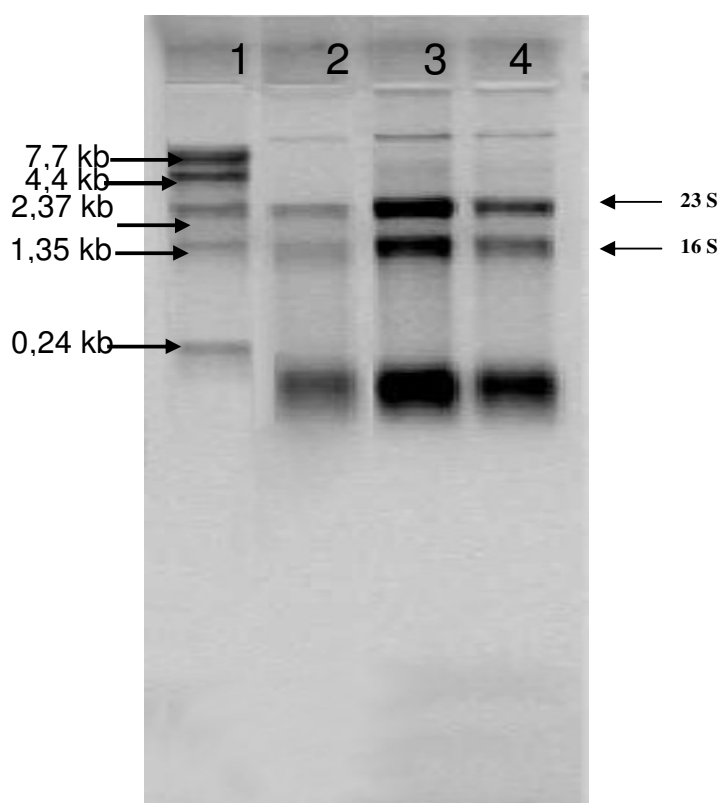


Figura 19: Perfil de qualidade do RNA total de bacterióides provenientes de plantas de soja 35 dias após o plantio avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante. **1** – Marcador de tamanho molecular: 0,24 – 9,4 kb Invitrogen ; **2** - RNA bacterióides 12 meses, **3** - 27 meses e **4** - 48 meses.

Tabela 6: Rendimento médio de RNA total obtido de bacterióides obtidos de plantas inoculadas com inoculantes de diferentes tempos de estocagem. Plantas com 35 dap

Amostra	Relação 260/280 nm	Rendimento µg	Gramas de nódulo / 30 plantas
Bacterióide 12 meses	1,75	8,3	1,3
Bacterióide 27 meses	1,8	36	5,9
Bacterióide 48 meses	1,6	25	2,45

PARTE III: Análise da expressão de genes envolvidos no processo respiratório de bradimirzóbio *in vitro* e *in planta*, por meio de quantificação relativa em PCR em tempo real.

1. Ensaio de validação de Primers, eficiência de cDNA e ensaio de Dissociação

Para ensaio de validação de primers e de cDNA, uma PCR quantitativa em tempo real absoluta foi realizada. Nesta, uma grande variedade de concentrações de primers e quantidades de cDNA em diversas diluições foram utilizadas afim de se verificar as melhores condições para aumentar assim a eficiência e, consequentemente, a especificidade da reação. Ao final deste processo as concentrações que apresentaram uma amplificação / emissão de fluorescência dentro dos mesmos padrões para as amostras analisadas foram escolhidos para a realização da qPCR. A análise dos primers se deu pela realização de reações contendo 200, 400 e 800 nM dos mesmos. À medida que a concentração de primers aumentou, uma diminuição no Ct foi observada. Após análise, a concentração de 800 nM foi a que apresentou a melhor amplificação tendo em vista o Ct que ocorrem as detecções.

A análise para determinação da concentração de primers esteve diretamente relacionada com a quantidade de cDNA na reação. O mesmo procedimento de

variação de concentração foi adotado para o cDNA, sendo que a quantidade de 1 µl do cDNA sintetizado como descrito no item 2a dos Materiais e Métodos foi o que apresentou melhores resultados associados a 800 nM de primer.

A quantificação gênica por PCR quantitativo em tempo real é uma técnica bastante rápida, reprodutível e de grande confiabilidade. Entretanto, a escolha do ensaio a ser utilizado influencia na estratégia a ser utilizada nas reações. Quando a quantificação está associada à SYBR Green, é necessário que seja avaliada a especificidade da reação em relação ao mesmo. Este fluoróforo, por se tratar de um intercalante de fitas duplas, emite fluorescência inclusive quando se liga a moléculas não alvo como dímeros de primers amplificados ou algum produto inespecífico. Esta fluorescência proveniente da interação com moléculas não alvo é detectada alterando os valores da quantificação. Para solução destes problemas, deve-se proceder a análise de dissociação. Curvas de dissociação (FIG. 19) são geradas no fim da PCR quantitativa absoluta, por aumento progressivo na temperatura da reação, calculando uma proporção na diminuição da emissão de fluorescência. Quando um único pico é observado na dissociação, indica que apenas um único produto está presente.

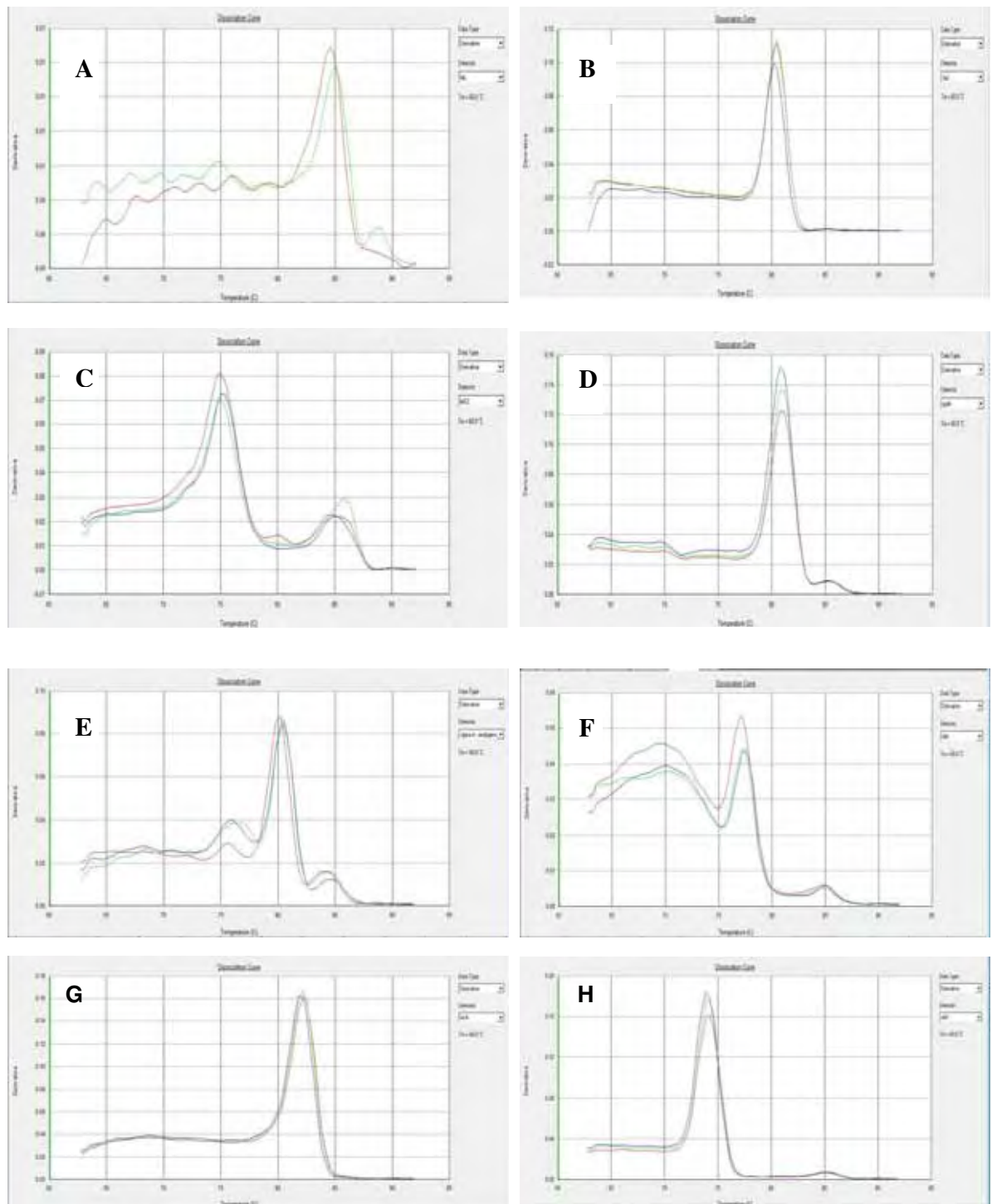


Figura 20: Curvas de dissociação geradas para validação da eficiência dos primers: **A** – *fixL*; **B**- *fixJ*; **C** – *fixK2*; **D**- *rpoN1*; **E** – *sigA*; **F** – *nifA*; **G** - *fixN*; **H** – *nifH*

2. Análise da expressão gênica relativa por PCR PCR em tempo real

Análise quantitativa de ácidos nucleicos tem um importante papel em diversos campos de pesquisa. A quantificação da expressão gênica tem sido extensamente utilizada no monitoramento de respostas biológicas a vários estímulos (TAN et al., 1994; HUANG et al., 1995A,B; PRUD'HOMME et al., 1995).

Mudanças celulares relativas à sobrevivência, crescimento e diferenciação, refletem em alterações nos padrões da expressão gênica e a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos sempre foi fundamental para qualquer investigação de função genética (ZAMORANO et al., 1996).

A análise da expressão dos genes relacionados à cascata responsiva a ambientes com baixa tensão de O₂, e que, conseqüentemente ativam os genes responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e processos relacionados, mostrou-se bastante variável quando comparada às diferentes condições analisadas neste trabalho.

A Figura 21 mostra a expressão relativa do gene *fixL* que codifica a proteína sensora FixL, que ativa, através de um evento fosforilativo, a proteína FixJ, dando início a uma cascata de transdução de sinal em resposta a concentrações em torno de 5% de oxigênio na forma gasosa (NELLEN-ANTHAMATTEN et al., 1998; SCIOTTI et al., 2003, HAUSER et al., 2006)

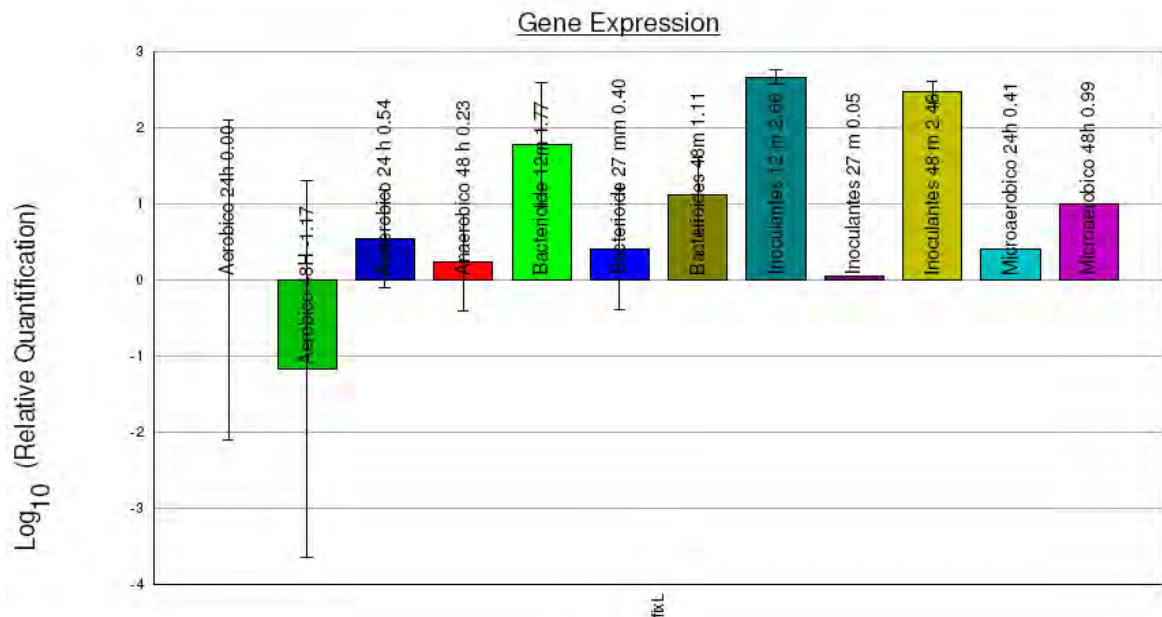


Figura 21: Taxas de Expressão do gene *fixL* por qPCR

Quando observamos os níveis de expressão de *fixL*, nota-se um evento de expressão negativa do mesmo na condição de aerobiose, expressão essa suprimida pelo excesso de oxigênio na atmosfera do meio. Ao analisarmos as culturas crescidas em atmosfera isenta de O₂, o nível de expressão do mesmo torna-se positivo, principalmente em 24 horas de cultivo (0.54 contra 0.23 para 48h). Na análise para bacterioides, a condição em que o gene *fixL* foi mais expresso foi na inoculação com inoculante de 12 meses de idade, dado que corrobora com a expressão do próprio inoculante de 12 meses, seguido do inoculante de 48 meses. Por fim em microaerobiose, a cultura de 48h apresentou nível de expressão mais elevado em relação à 24h.

Os genes *fixL* e *fixJ* de *Ensifer* ((*Sino*) *rhizobium*) *meliloti* (DAVID et al, 1988) foram originalmente identificados por seu papel na ativação dos operons *fixNOQP* e *fixGHIS*, bem como para a ativação do *nifA* sob condições de baixa tensão de oxigênio. Subsequentemente, estes genes foram identificados em *B. japonicum* (ANTHAMATTEN et al., 1991) e *A. caulinodans* (JOERGER et al., 1986), além de fixadores do gênero *Frankia* (MURRY et al., 1993). Análise de sequências de DNA

dos genes *fixLJ* de *Ensifer meliloti*, *B. japonicum* e *A. caulinodans* mostraram fortes indícios de que eles estão organizados em um operon nas três espécies (FISCHER, 1994).

Em *Bradyrhizobium japonicum*, o operon *fixLJ* aparece expresso tanto em condição microaeróbicas quanto anaeróbicas, embora em níveis ligeiramente diferentes (ANTHAMATTEN et al., 1991), o que corrobora os dados obtidos em nossos experimentos. Mutações em *fixL* ou *fixJ* de *Ensifer meliloti* e *A. caulinodans* resultaram na formação de nódulos simbioticamente ineficientes (Fix⁻). A atividade da nitrogenase em *A. caulinodans*, mutantes de vida livre, é drasticamente reduzida. Do mesmo modo, mutantes *fixLJ* de *B. japonicum* mostram uma perda de cerca de 90% da atividade simbiótica de fixação de nitrogênio, tornando-se incapazes de crescer anaerobicamente utilizando nitrato como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória. Estes dados sugerem a participação de FixLJ na respiração através de nitrato (ANTHAMATTEN et al., 1991).

Saito et al. (2003), em estudos com mutantes de *Ensifer meliloti* mutados na região sensora ao oxigênio (FixLJ), verificaram que o processo de autofosforilação de *fixL* e posteriormente fosforilação de *fixJ* não ocorria. Adicionalmente verificaram alterações na conformação das proteínas FixLJ purificadas. A expressão de *fixL* (FIG. 21) apresentou-se elevada para os inoculantes de 12 meses e de 48 meses de fabricação, demonstrando que a expressão deste gene ocorre em períodos iniciais e tardios de estoque, podendo estar relacionado com a depleção do oxigênio gasoso na embalagem dado a atividade celular inicial que levou a seu esgotamento.

O gene *fixJ* (FIG. 22) apresentou maior expressão quando estava a condição de bacterióide de plantas inoculadas com Inoculante de 27 meses, valor inverso ao obtido para *fixL*, sugerindo que no momento experimental, a autofosforilação de *fixL* já teria ocorrido, sendo assim e a ativação de *fixJ* foi mais proeminente no momento da coleta ou mesmo através de modificações pós-transcricionais. Os níveis de expressão referem-se aos transcritos de RNA produzidos em cada situação. Para os inoculantes e culturas crescidas microaerobicamente, os níveis de expressão decresceram bastante quando comparados com *fixL*.

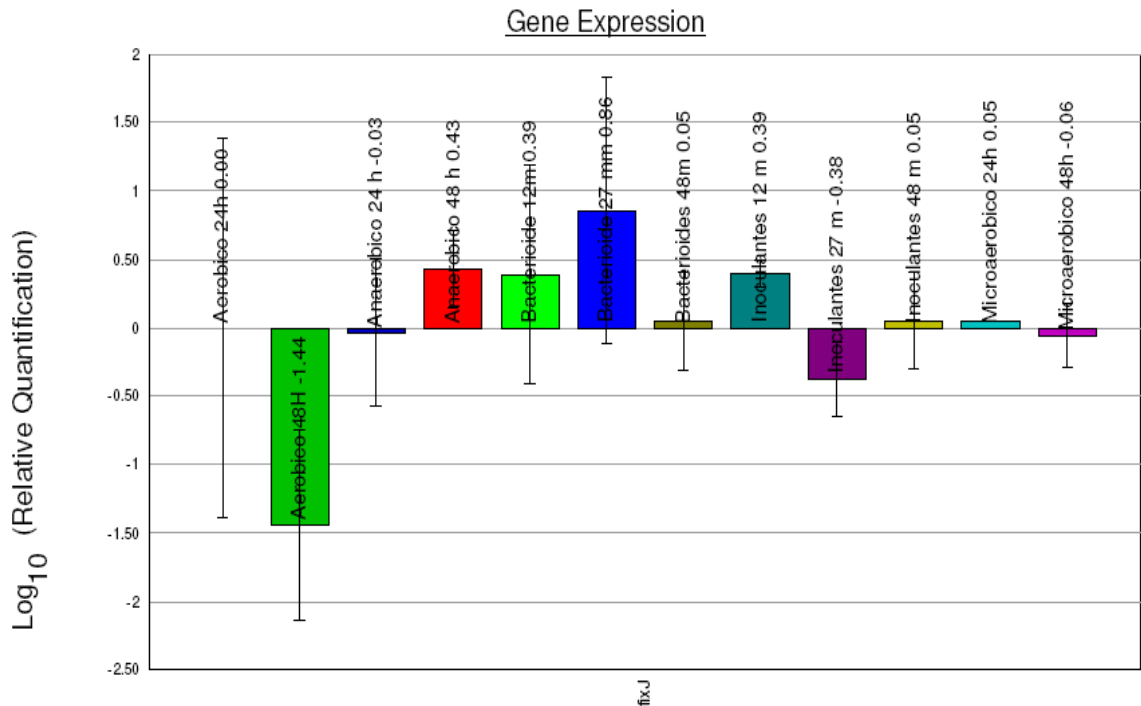


Figura 22: Taxas de Expressão do gene *fixJ* por qPCR

A expressão dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio e na simbiose em *B. japonicum*, como já descrito, estão fortemente relacionados com duas cascatas regulatórias (Fischer, 1994). Em cada cascata, 3 níveis de controle podem ser observados: I – sistemas regulatórios de dois componentes sensíveis ao oxigênio (FixLJ e RegSR); II – um regulador chave (FixK₂ e NifA) e III - o regulon alvo. A primeira cascata é composta pelo sistema regulatório FixLJ, pelo regulador chave FixK₂ e pelo regulon alvo que contém os genes relacionados às condições de vida microaeróbicas e anaeróbicas.

Após a fosforilação de ambos, FixLJ, é ativada a transcrição de *fixK₂*. Este último regulador, transcrucional relacionado à expressão dos operons *fixNOQP* e *fixGHIS* na presença de condições inadequadas de oxigênio (> 5%), que por sua vez, tem funções relacionadas com a síntese de uma citocromo oxidase com altíssima afinidade ao oxigênio e adicionalmente, ativação de *rpoN1* codificador do fator

transcricional sigma⁵⁴ especializado (SCIOTTI et al., 2003). A proteína FixK regula negativamente a expressão de *fixK₂* em *Ensifer meliloti*, pela ativação do gene *fixT*, cujo produto inibe o sistema FixLJ (FOUSSARD et al., 1997).

A análise através da qPCR demonstrou maiores níveis de expressão de *fixK₂* em bacterióides de 12 meses e 48 meses, respectivamente. Além desses, apresentaram aumento em sua expressão as células em condição anaeróbica, por 24 horas, e microaeróbica cultivada por 48 horas. Em todas as outras situações, a expressão do gene apresentou baixos níveis, sendo que nos inoculantes a expressão em todas as idades mostrou níveis parecidos (FIG. 23).

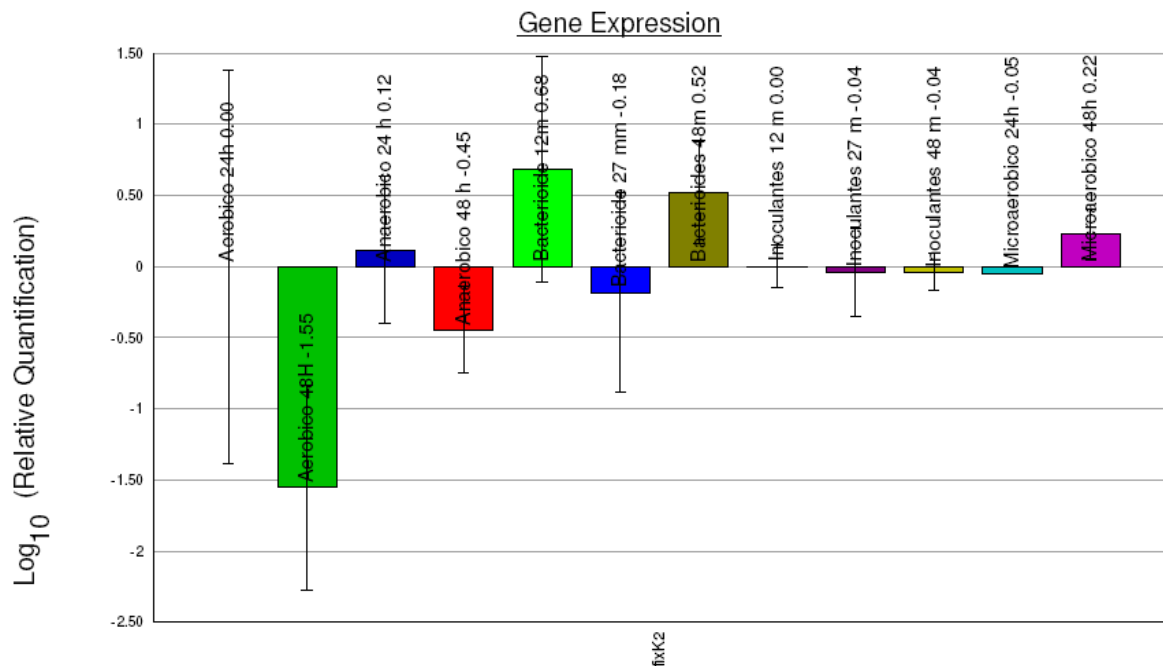


Figura 23: Taxas de Expressão do gene *fixK₂* por qPCR

Nellen-Anthamatten et al, (1998), descreveram a proteína FixK₂ como sendo crucial para o controle dos genes induzidos sob baixa tensão de oxigênio, papel este que pode ser observado na Figura 24.

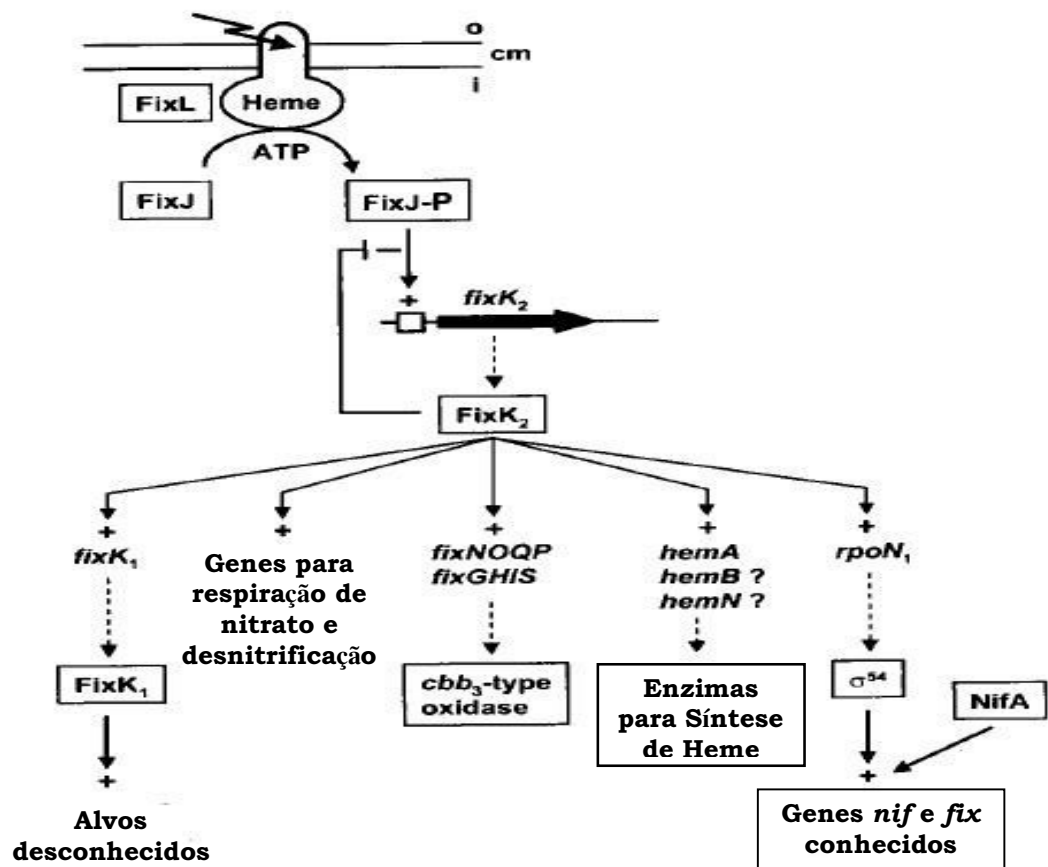


Figura 24: Papel central de *fixK₂* como regulador dos genes envolvidos nos processos da fixação simbiótica de nitrogênio (adaptado de NELLEN-ANTHAMATTEN et al., 1998)

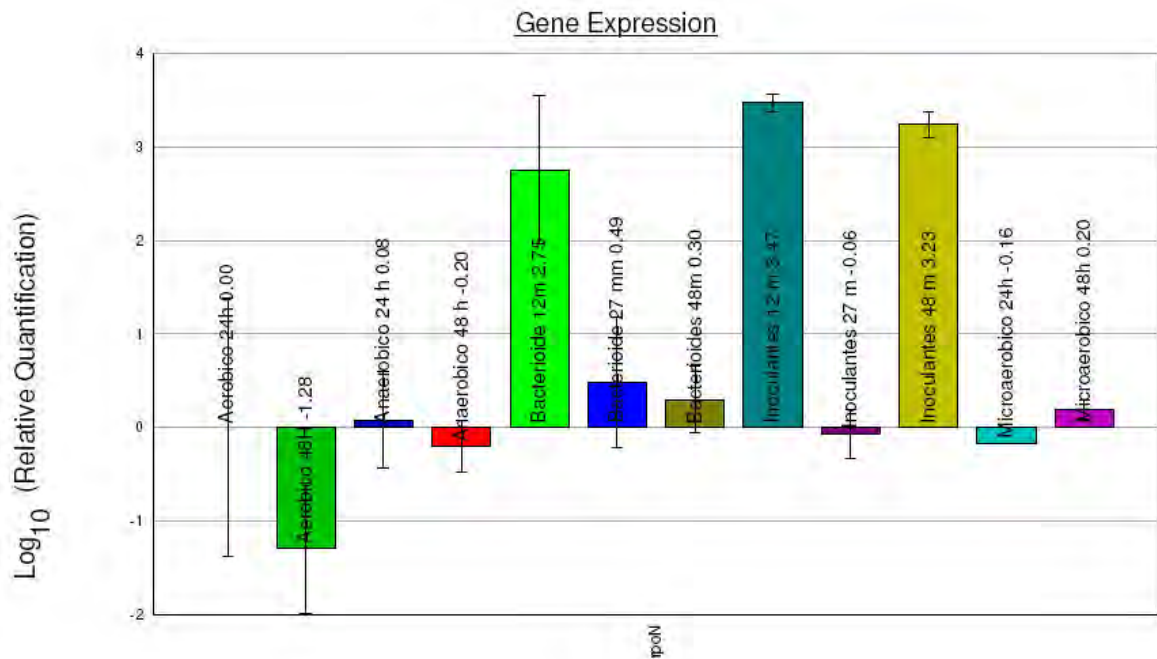


Figura 25: Taxas de Expressão do gene *rpoN₁* por qPCR

Quando analisamos a expressão do gene *rpoN₁* (σ^{54}) (FIG. 25), que codifica uma subunidade da RNA polimerase, o nível de expressão observado em bacterióides provenientes de inoculações com inoculantes de 12 meses foi o mais proeminente para o grupo dos bacterióides, sendo observado uma queda nos bacterióides inoculados com inoculantes estocados por maior período de tempo (27 meses e 48 meses). Contudo, os inoculantes de 12 meses e 48 meses apresentaram o mais alto nível de expressão dentre todas as condições experimentais. Nota-se uma expressão discreta deste gene em anaeróbico 24 horas e microaeróbico 48 horas. O fato dos inoculantes apresentarem expressão elevada para este gene, corroboram com a expressão encontrada para o sensor *fixL*, que apresenta os mesmos padrões de expressão.

Outro ativador transcricional de papel fundamental na cascata de ativação de genes envolvido no processo de fixação do nitrogênio é o gene *nifA*. O gene *nifA* de *B. japonicum* e *A. caulinodans* foram primeiramente identificados por sua homologia

com o *nifA* de *Klebsiella pneumoniae* e *Ensifer meliloti*, sendo que sua função regulatória foi confirmada por análise mutacional (EVANS et al., 1988). NifA atua em *B. japonicum* conjuntamente com o fator σ^{54} , assim, o fator RpoN₁, representa uma ligação entre as duas cascatas regulatórias, FixLJ e RegSR

A análise quantitativa de *nifA* (FIG. 26) demonstrou uma forte expressão do mesmo em bacterióides 12 meses, seguido de microaeróbico 48 horas e anaeróbico 24 horas. Níveis transcripcionais mais discretos foram observados para bacterióide 48 meses e microaeróbico 24 horas. As análises de inoculantes, independente da idade, mostraram-se reguladas negativamente.

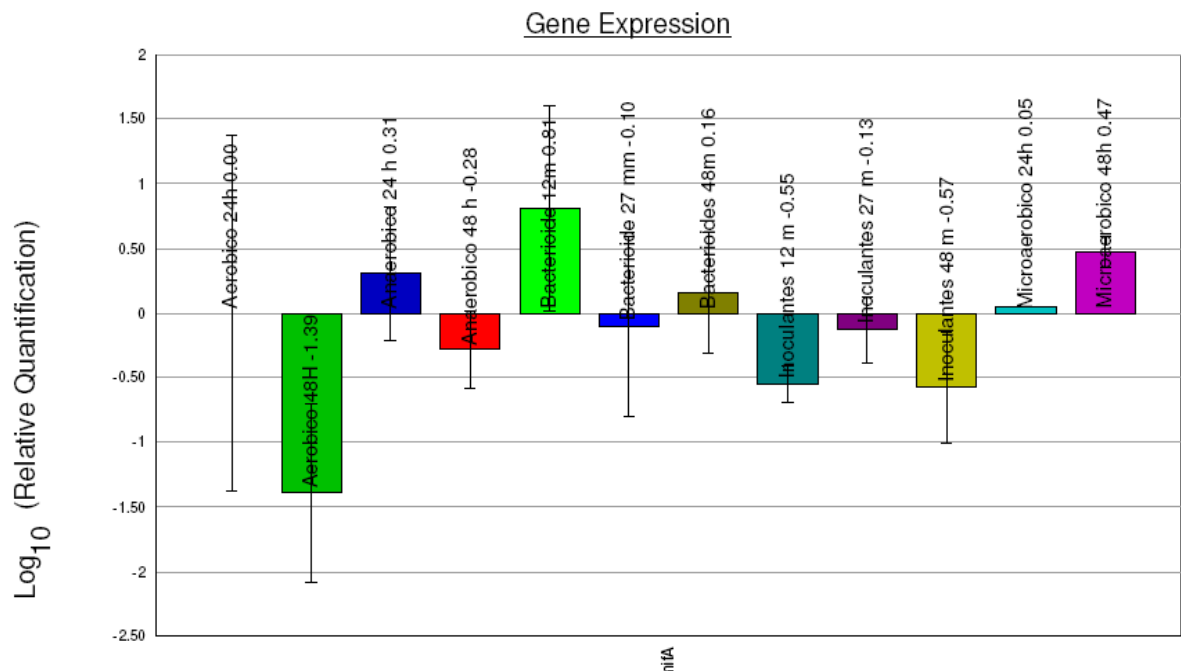


Figura 26: Taxas de Expressão do gene *nifA* por qPCR

Como já extensamente citado, as espécies fixadoras de nitrogênio necessitam de um ambiente com condições restritivas em oxigênio para funcionamento e ativação do processo de fixação, uma vez que a enzima que realiza este processo é extremamente sensível ao oxigênio. Sendo assim, diversos mecanismos estão

envolvidos no processo de formação de um ambiente apropriado. Além das barreiras físicas fornecidas pelo ambiente do nódulo fixador, e substâncias como a leghemoglobina que carrega oxigênio, um terceiro processo remete a síntese de uma citocromo oxidase com altíssima afinidade ao oxigênio, codificada pelo gene *fixN*.

Nossos resultados mostraram atividade intensa do gene responsável pela síntese dessa citocromo c-oxidase terminal (FIG. 27). O nível de expressão mais notável foi para ambiente microaeróbico de 48 horas. As condições de anaerobiose sejam para 24 horas, ou 48 horas, apresentaram níveis consideráveis de expressão, uma vez que esse gene, assim como todos os outros citados, se expressa em condições de baixa tensão de oxigênio. Além disso, este gene está sob controle da cascata FixLJ, que é ativada a uma concentração de 5% de oxigênio. Um baixo nível de expressão de *fixN* foi observado nos inoculantes, apesar do fato destes estarem nas embalagens com uma baixa tensão de oxigênio.

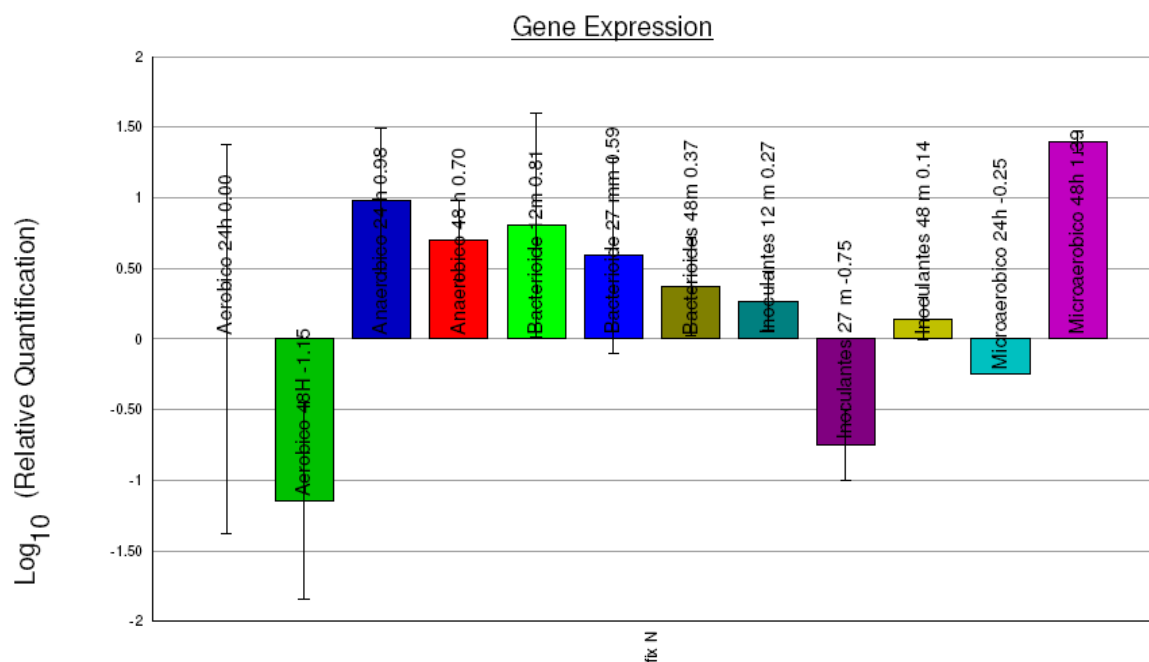


Figura 27: Taxas de Expressão do gene *fixN* por qPCR

Toda a cascata regulatória e a quantidade de genes envolvidos nesse processo estão relacionados a uma regulação gênica do processo de fixação, finamente controlado. Como este é bastante custoso energeticamente, deve se fazer ativo apenas em condições totalmente controladas e em momentos propícios. O gene *nifH* relacionado com a síntese de uma das subunidades do complexo nitrogenase, que é altamente lábil à presença de oxigênio, é um dos genes cuja expressão depende de muitos outros genes e fatores, dos quais alguns já foram descritos anteriormente.

Os dados encontrados em nossos experimentos direcionam a expressão gênica às condições endossimbiotes (bacterióides), uma vez que é neste que estará ocorrendo o processo de redução do nitrogênio atmosférico. A expressão mais acentuada foi nos bacterióides isolados de plantas inoculadas com o inoculante de menos idade (12 meses), seguido dos bacterióides 27 e 48 meses, respectivamente (FIG. 28). Um pequeno nível de expressão pôde ser observado na cultura crescida microaeróbicamente durante 48 horas.

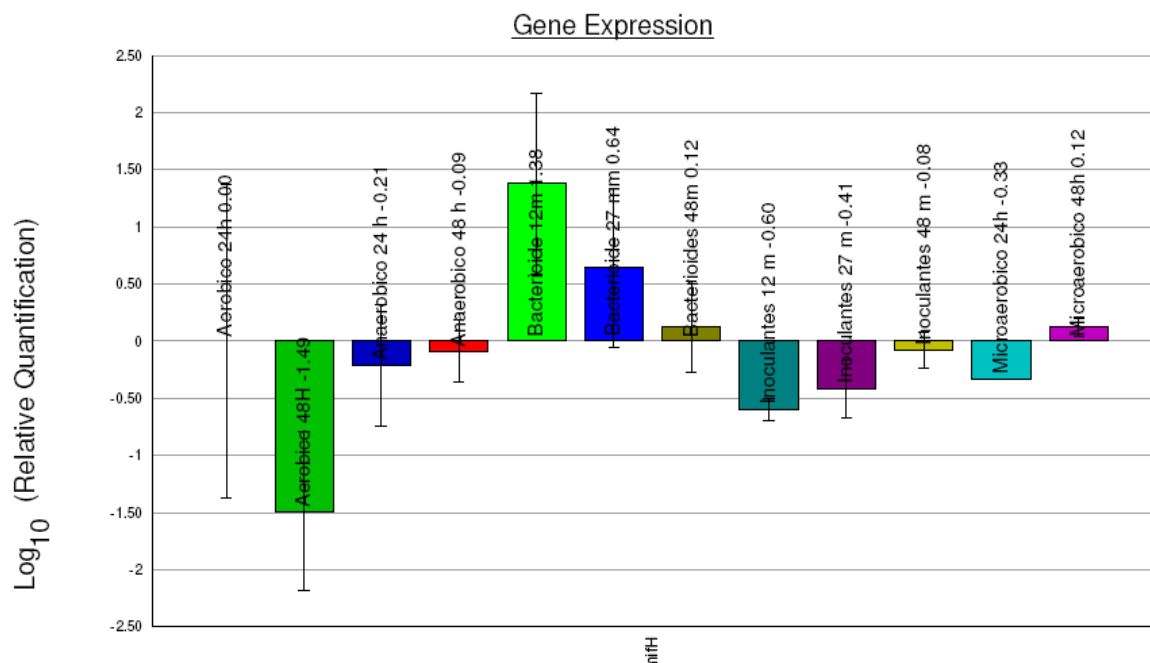


Figura 28: Taxas de Expressão do gene *nifH* por qPCR

3. Fisiologia de bradirrízobios *in vitro* e *in planta*

É importante ressaltar que a análise por qPCR está fundamentada em transcritos de RNA expressos, e não em proteínas que refletem funcionalidade/fenótipo de determinado gene. Assim, pode ocorrer um “lag” entre momento celular de expressão de determinado gene, quando o RNA foi isolado, e a proteína correspondente expressa.

Adicionalmente, um controle pós-traducional é normalmente utilizado por rizóbios para controlar o metabolismo respiratório e de fixação de nitrogênio (FISCHER, 1994; CRAWFORD et al., 2000).

Para um melhor entendimento dos fenômenos fisiológicos relacionados a cada condição, a saber, cultivo “*in vitro*”, restritivo em oxigênio (FIG. 29), inoculantes com diferentes idades (FIG. 30) e bacterióides (FIG. 31), os dados foram agrupados conforme observado.

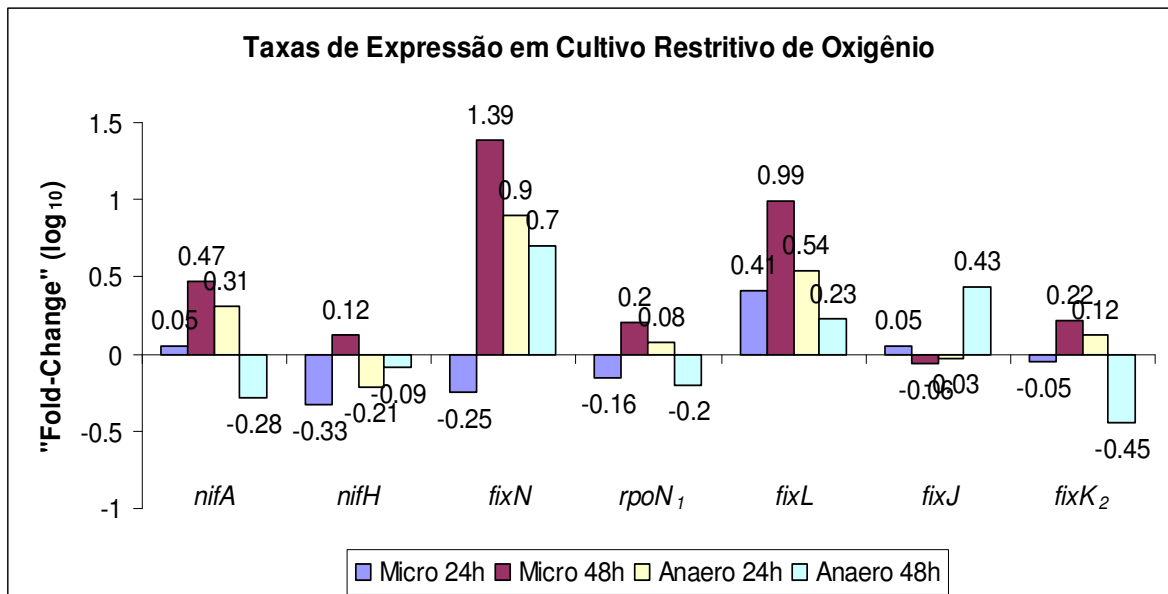


Figura 29: Taxas de expressão gênica para as culturas em cultivos restritivos em O₂

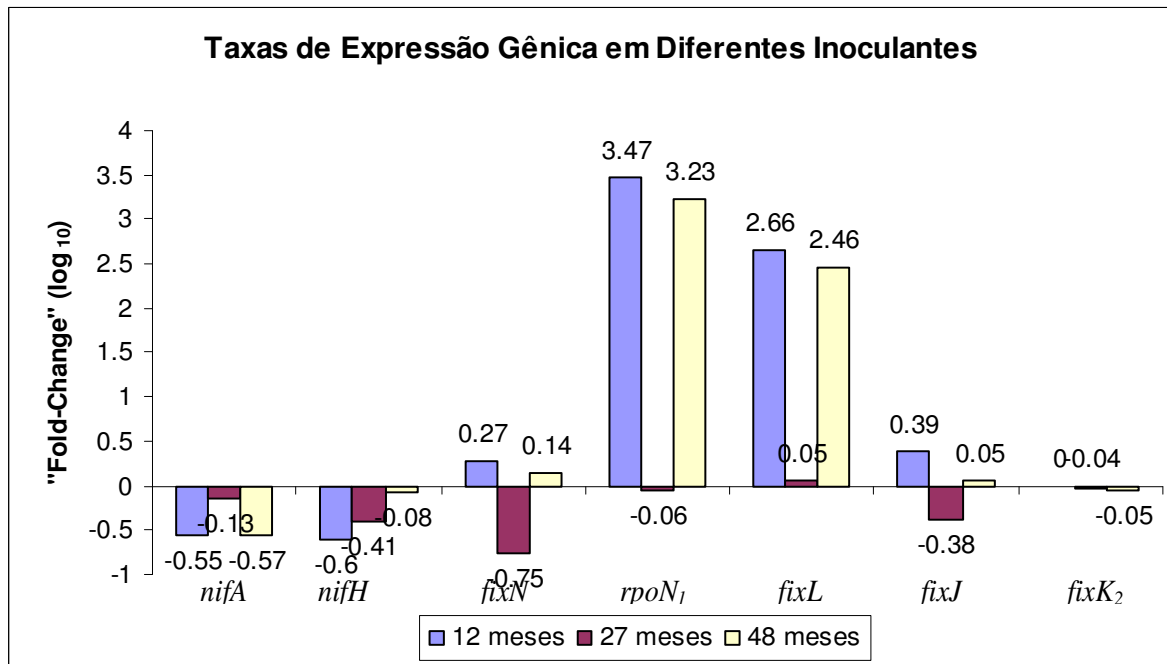


Figura 30: Taxas de expressão gênica para inoculantes em diferentes idades

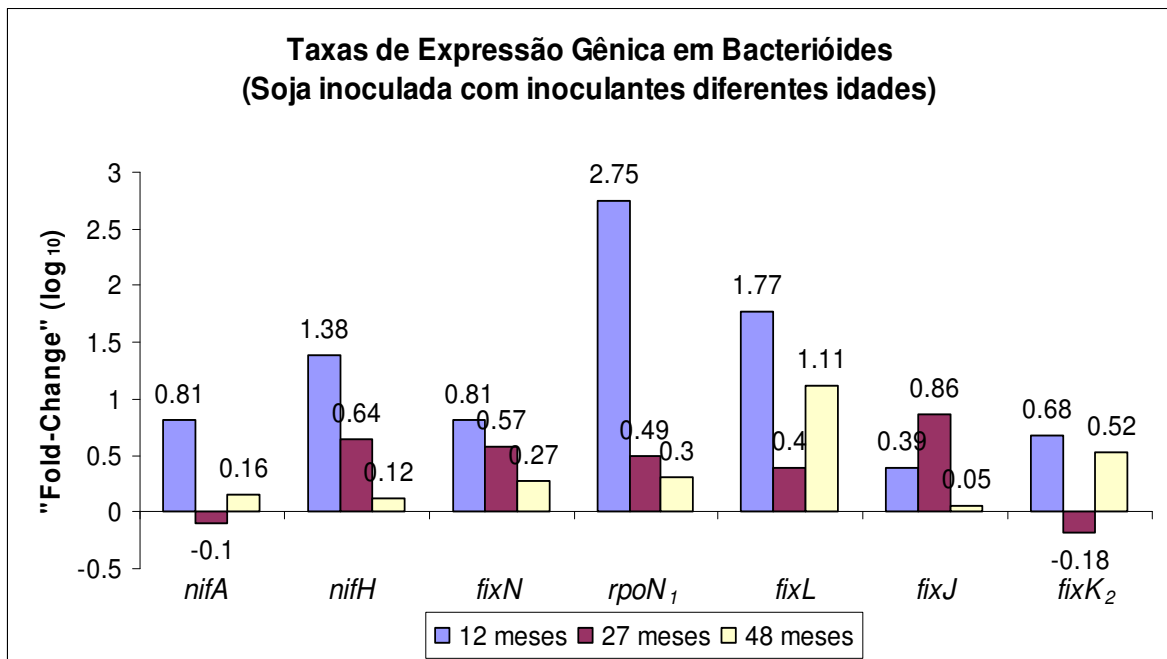


Figura 31: Taxas de expressão gênica para bacterióides obtidos após inoculação com inoculantes em diferentes idades

Os genes acima discutidos até o momento estão todos relacionados com mecanismos regulados em função do oxigênio. Porém, deve-se considerar outros fatores limitantes aos processos de estabelecimento do processo simbiótico, e consequentemente à redução do nitrogênio atmosférico. Um desses fatores é a presença de nitrogênio em formas assimiláveis no solo. Uma vez que o processo de fixação é bastante custoso energeticamente, apenas na ausência deste nutriente o processo ocorre. Outros genes considerados reguladores também atuam impedindo o funcionamento da cascata de ativação de genes da fixação em resposta ao nitrogênio, principalmente o regulador *nifA*.

A maior expressão de *fixL* foi encontrada para condições microaeróbica 48 horas de cultura e anaeróbica 24 horas. Entretanto, todos os analisados sob condições microaeróbicas ou anaeróbicas apresentaram expressão aumentada. O gene *fixJ* apresentou queda na expressão para microaeróbicos e anaeróbicos 24 horas, e um aumento da expressão do mesmo quando analisado em 48 horas.

O gene *fixN* apareceu altamente expresso em microaeróbicos 48 horas, enquanto em 24 horas a expressão foi reprimida. Isso pode ser devido a um período de adaptação às condições em que foram submetidas as culturas. Por outro lado, o anaeróbico 24 horas apresentou expressão maior do que em 48 horas. O *rpoN*_I relacionado com a ativação dos genes *nifA* e *nifH* apresentou pequenas taxas de expressão ou reprimida. Em duas condições, microaeróbico 48 horas e anaeróbicos 24 horas, nota-se a proeminente expressão do *nifA* que atua somente em condições altamente restritas de oxigenação, demonstrando que o processo de anaerobiose em que foram realizados os experimentos foi eficiente. Um aumento da expressão em microaeróbicos durante o cultivo de 48 horas pode ser atribuído ao consumo do oxigênio antes encontrado pelos microrganismos presentes, colaborando assim para a ativação de *nifA*. Mas apesar da expressão de *nifA*, não foi verificada a expressão do *nifH*. Esses dados corroboram com os encontrados em inoculantes, em que os mecanismos de ativação do processo, existem e estão ativos até determinados níveis, entretanto o processo não ocorre a menos que esteja em simbiose.

O gene sensor primário ao oxigênio, *fixL*, foi expresso em todas as condições analisadas, exceto na cultura crescida aerobicamente. As culturas aeróbicas foram utilizadas como controle, uma vez que todos os genes analisados requerem ambientes com tensão de oxigênio reduzido para se expressarem. Hauser e colaboradores (2006) em um microarranjo piloto de *B. japonicum*, cultivado com apenas 0,5% de oxigênio gasoso, observaram a expressão de diversos genes responsivos a baixas concentrações de oxigênio, tais como *fixN* (altamente expresso), *fixK₂*, *rpoN₁* e até mesmo *nifH*. Resultados parecidos foram observados em um macroarranjo realizado por Bergès et. al. (2003) para *Ensifer meliloti*, em que os genes *fixKNP* foram induzidos após a redução da concentração de oxigênio. Souza (2006) em um microarranjo parcial de *B. elkanii*, detectou a presença de *fixN* em culturas líquidas, além da presença de uma superóxido dismutase e uma catalase. Estes genes têm papel antioxidante relacionado à defesa celular e atuam na decomposição de radicais livres de oxigênio e do peróxido de hidrogênio gerado durante atividade da dismutase. A presença destes genes é indicativo de uma situação de estresse, que foi observada nas fases de adaptação (fase lag) ou de baixa disponibilidade de recursos, durante a fase estacionária (SOUZA, 2006). Estes dados corroboram os encontrados em nossas análises, em que a simulação de um ambiente com níveis reduzidos de oxigênio, é capaz de desencadear a expressão de diversos genes.

Nos inoculantes analisados, o *fixL* foi altamente expresso naqueles estocados durante 12 meses e 48 meses (maiores “fold-change”) sugerindo que uma redução no oxigênio contido no interior da embalagem comercial ocorre. Estes dados corroboram os dados encontrados para análise da cadeia respiratória através de ensaio bioquímico, em que as menores taxas respiratórias foram encontradas para os mesmos inoculantes. O gene *fixJ* apresentou sua expressão conforme padrão encontrado no *fixL*, exceto pela expressão reprimida em inoculante de 27 meses.

O gene *fixK₂* está diretamente ligado a ativação dos genes responsáveis pela síntese da citocromo oxidase terminal produzida por *fixN*. Contudo, nossos dados obtidos para análise de *fixN* demonstraram que nos inoculantes de 12 meses e de 48

meses houve uma expressão aumentada e no de 27 meses expressão reprimida. Como este gene depende da ativação de *fixK₂*, e este não apresentar expressão significativa, o mesmo pode já ter sido expresso no momento experimental. Dados que corroboram com a expressão encontrada para *fixLJ*. O fator transcricional *rpoN₁*, expresso na maioria das condições, é o elo encontrado entre as duas cascatas que envolvem os receptores ao oxigênio e a cascata com os genes que codificam o complexo enzimático nitrogenase. O regulador transcricional *nifA* apresentou expressão reprimida para todas as idades, assim como o outro gene chave para a síntese do complexo enzimático, o gene *nifH*.

Os dados acima descritos no permitem aferir que nas embalagens de inoculantes comerciais fabricados a base de bradirrizóbios, ocorre uma diminuição drástica na tensão de oxigênio, haja vista que os genes da cascata sensora FixLJ apresentaram-se expressos, assim como os genes intermediários, tais como o fator transcricional *rpoN₁*. Há de se ressaltar, a expressão aumentada do gene responsável pela síntese do citocromo acessório aos mecanismos de controle do oxigênio, o *fixN*. Sendo assim, tudo indica que a maquinaria celular bacteriana está preparada para um possível processo de fixação desencadeado pela diminuição da tensão de oxigênio; entretanto, este processo não ocorre, fato evidenciado pela expressão negativa do regulador dos genes da fixação *nifA* e do gene da dinitrogenase.

A análise da expressão gênica encontrada para bacterioídes demonstrou um grande aumento para *fixL* principalmente no de 12 meses, seguido por 48 meses e 27 meses (respectiva ordem de aumento). A expressão de *fixJ* mostrou-se inversamente proporcional, indicando o momento experimental em que o *fixL* já transmitiu o sinal através do processo fosforilativo para o gene subsequente. O gene *fixK₂* apresentou-se bastante expresso também em 12 meses e 48 meses, sendo expresso negativamente em 27 meses. O perfil transcricional dos genes da cascata sensora ao oxigênio FIXLJ-FIXK₂ demonstra uma queda a níveis de oxigênio, uma vez que se trata da forma endossimbionte, e no ambiente nodular a queda deve ser um tanto quanto acentuada para o funcionamento do complexo nitrogenase. Outro

gene que colabora para que este processo ocorra, o *fixN*, apresentou-se expresso em todas as condições, principalmente em bacterióides 12 meses uma vez que a citocromo oxidase com afinidade por oxigênio precisa estar ativa no ambiente nodular onde ocorre os eventos da redução do nitrogênio. O fator transcricional *rpoN*₁ apresentou alta expressão em bacterióides produzidos com inoculantes de 12 meses, decaindo com o aumento da idade do inoculante utilizado. Assim como aconteceu para os genes anteriormente descritos, a análise de *nifA* apresentou um aumento de expressão principalmente em 12 meses. Uma vez que este está expresso, evidencia-se a queda muito grande na tensão de oxigênio no ambiente nodular, pois o mesmo só se expressa em tensões de oxigênio inferiores a 0,5% (HAUSER et al., 2006). Por fim, o alvo final da cascata de ativação, o gene *nifH*, apresentou-se expresso em todas as condições e bacterióides analisadas, indicando assim que no momento da coleta experimental o processo de fixação estava ocorrendo.

Após as análises de expressão descritas acima, há de se evidenciar que os genes analisados apresentaram padrão de expressão parecido, e na maioria, os maiores níveis de expressão foram encontrados nos bacterióides isolados de plantas inoculadas com inoculante de 12 meses de idade, seguido por 27 meses e posteriormente por 48 meses (principalmente *fixN*, *rpoN*₁, *nifA* e *nifH*). Este perfil pode ser indicativo de que, apesar dos inoculantes apresentarem número de células e eficiência de nodulação dentro de certos padrões, o tempo de estocagem parece afetar os genes envolvidos no processo de fixação. Sendo assim, o processo de estocagem por longos períodos pode ser inviável, uma vez que afeta a viabilidade gênica.

O fato de inoculantes com mais tempo de prateleiras terem causado eficiente nodulação em raízes de soja pode estar relacionado ao fato de que durante o armazenamento as células e o meio acumularam EPS e LPS (MARTINS et al., 1997). Estes compostos são reconhecidos como moléculas importantes para o fenômeno de reconhecimento, interação e aderência dos rizóbios nas raízes da planta hospedeira (STOUGAARD, 2000). Esta interação inicial dispara na planta

mecanismos de respostas que induzem a divisão das células meristemáticas no córtex radicular, dando origem ao nódulo. Contudo, como nos inoculantes mais velhos o número de células fisiologicamente foi menor, a colonização destes nódulos não foi bastante eficiente. Ou seja, as células induziram a formação do nódulo radicular, contudo, houve pouca infecção. Este fenômeno de colonização ineficiente de nódulos seria responsável pela detecção de baixos níveis de expressão de genes relacionados à respiração microaerofílica e fixação do nitrogênio.

Através dos dados obtidos no presente trabalho há de se evidenciar que o tempo de estoque dos inoculantes comerciais é de fundamental importância para a maximização do processo de fixação biológica de nitrogênio hoje tão difundido. E que apesar da viabilidade em número de células como observado para o inoculante estocado durante 27 meses, a funcionalidade dos genes envolvidos no processo podem estar comprometidos como indicado através das análises de expressão gênica.

V. CONCLUSÕES

1. As culturas crescidas em diferentes tensões de oxigênio, aumentaram o pH, DO, e número de células a medida que aumentou o de tempo de cultivo (de 24 para 48 horas), demonstrando que a mudança na tensão de oxigênio afeta o desenvolvimento e metabolismo nas primeiras 24 horas tendendo a aumentar em 48 horas (adaptação ao ambiente).
2. O processo de estocagem dos inoculantes até 27 meses não afetou o número de células, permanecendo dentro dos padrões recomendados pelas entidades fiscalizadoras, mas decaindo após este período.
3. A análise da cinética respiratória através do ensaio de redução do INT a INT-Formazan indicam uma atividade respiratória mais acentuada no inoculante de 27 meses que também é o que apresenta maior numero de células.
4. Os genes sensores iniciais *fixLJ* apresentaram-se expressos nas mais diversas condições, inclusive em inoculantes comerciais, indicando uma queda na tensão de oxigênio na embalagem de estoque.
5. A expressão do gene responsável pela produção de uma citocromo oxidase, *fixN*, ocorreu em diversas condições, indicando que a maquinaria celular bacteriana está preparada para um possível processo de fixação desencadeado pela diminuição da tensão de oxigênio.
6. Análise da expressão gênica dos bacterióides isolados de plantas inoculadas com os inoculantes de diferentes idades evidenciou uma queda na expressão dos genes intimamente relacionados com o processo de fixação tais como *fixN*, *rpoN*₁, *nifA* e *nifH*, decaindo a expressão a medida que aumenta o tempo de estocagem.

7. Alterações fisiológicas podem ser responsáveis pela capacidade de sobrevivência dos bradirrizóbios nas embalagens comerciais com oxigênio limitado por longos períodos.

8. A estocagem dos inoculantes por longos períodos pode ser inviável, pois a idade do mesmo esteve diretamente relacionada com a capacidade de funcionamento dos genes relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHAMATTEN, D., H. HENNECKE. The regulatory status of the fixL-like and flJ-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 225, p. 38-48, 1991.

ARAÚJO, A.C.B. **Inoculante oleoso e sobrevivência do rizóbio submetido a seca e alta temperatura após a semeadura do feijoeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.

ARAÚJO, E.S.; JANTÁLIA, C.P.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. Importância do N das raízes de soja para a produtividade da cultura sucessora e para o balanço do N do sistema. **Circular Técnica**, Seropédica, n.14, p.1-4, 2006.

ARAÚJO, S.C. A inoculação de leguminosas. Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, 1997. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>. Acesso em 16 jun 2009.

BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BEALE, S. I. Biosynthesis of hemes. *In* NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E.C.C., LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (ed.), ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology***, Washington D.C.: ASM Press, 2nd ed. 1996. p. 731–748.

BERGÈS, H.; LAUBER, E.; LIEBE, C.; BATUT, J.; KAHN, D.; BRUIJN, F.J.; AMPE, F. Development of *Sinorhizobium meliloti* Pilot Macroarrays for Transcriptome Analysis **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1214–1219, 2003.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, Londres, v.84, p.188-198, 1974.

BISHOP, P.E.; GUEVARRA, J.G.; ENGELKE, J.A.; EVANS, H.J. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.57, p.542-546, 1976.

BREWIN, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, California, v.7, p.191-226, 2001.

BURRIS, R.H. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.54, p.443-449, 1974.

CAETANO-ANOLLÉS, G. & GRESSHOFF, P.M. Plant genetic control of nodulation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, California , v.45, p.345-382, 1991.

CAMPANHARO, J.C. **Identificação de Estirpes de Bradirrizóbios Recomendados para Soja e Avaliação dos Inoculantes Comerciais**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

CAMPOS, B.C Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 29, n.3, 1999.

CAMPOS, B.C. & GNATTA, V. Inoculantes e fertilizantes foliares na soja em área de populações estabelecidas de *Bradyrhizobium* sob sistema plantio direto **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, SP, v. 30, p.69-76, 2006.

CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Nutrição nitrogenada da soja para a obtenção de altos rendimentos. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 7., INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4., BRAZILIAN **SOYBEAN CONGRESS, 3. Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, 2004.

CASSMAN, K.G. Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality and precision agriculture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 96, p.5952-5959, 1999.

CATTELAN, A.J.; HUNGRIA, M. **Nitrogen nutrition and inoculation, p.201-215. In: Tropical Soybean: improvement and production.** FAO Plant Production and Protection Series, n. 27, FAO press, Roma, Itália, 1994.

CHOHAN, S.N.; COPELAND, L. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium (Cicer)* sp. Strain CC 1192. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2859-2863, 1998.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 23 jun 2009.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. **Nitrogen and Sulfur.** In:BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p.786, 2000.

DAVID, M.; DAVERAN, M.L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*. **Cell**, St. Louis, MO, v.54, p.671-683, 1988.

DELORIT, R.J.; GUNN, C.R. **Seeds of continental United States legumes (Fabaceae)**. Park Falls, WI, USA, F.A. Weber and Sons, Lithographers, 1986.

DESHMANE, N.; STACEY, G. Identification of *Bradyrhizobium nod* genes involved in host-specific nodulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v.171, p.3324-3330, 1989.

DIXON, R.& KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.** Londres, v.2, p. 621-31, 2004.

ELLINGBOE, A.H. Changing concepts in host-pathogen genetics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, California, v.19, p.125-143, 1981.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em : <http://www.bacterio.net>. Acesso em 30 jul 2009.

EVANS, D.; JONES, R.; WOODLEY, P.; ROBSON, R. Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococcum*: identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nifS*, *nifV*, *nifM* and *nifB* genes and localization of *nifEiN*-, *nifU*-, *nifA*- and *fixABC*-like genes. **J. Gen. Microbiol.** Londres, v. 134, p. 931-942, 1988.

FISCHER, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological Reviews**, Washington, US, v.58, p.352-386, 1994.

FOUSSARD, M.; GARNERONE, A.M.; NI, F.; SOUPENE, E.; BOISTARD, P.; BATUT, J. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. **Mol. Microbiol.** Salem, Mass., v. 5, p. 27–37, 1997.

FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 121-140, 1992.

FREIRE, J.R.J; SCHOLLES, D. The use and management of Rhizobial/Legumes inoculants. In: BALATTI, A.P. JARDIM-FREIRE, J.R. (ED.) **Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, and use management**. La Plata: Editorial Kingraf, p. 138-148, 1996.

GARRITY, G.M. (editor) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005.

GILLER, K.E.. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. CAB International, Wallingford, UK, 2001.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Can. J. Microbiol.** 38:475-484. 1992.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for pH tolerance of *Rhizobium tropici* UMR **Can. J. Microbiol.** Ottawa, CA, v. 40, p. 198-207, 1989.

GRAHAM, P. H., HUNGRIA, M., TLUSTY, B. Breeding for better nitrogen fixation in grain legumes: Where do the rhizobia fit in? **Online. Crop Management**, 2004.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Journal of Nutrition**. v.130, p.1081-1084, 2000.

HAUSER, F.; LINDEMANN, A.; VUILLEUMIER, S.; PATRIGNANI, A.; SCHLAPBACH, R.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Design and validation of a partial-genome microarray for transcriptional profiling of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region. **Mol Gen Genomics**, Berlin, v.275, p. 55-67, 2006.

HENNECKE, H.; NELLEN-ANTHAMATTEN, D.; ROSSI, P. ; PREISIG, O. ; KULLIK, I. ; BABST, M. FISCHER, H. M. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a Crucial Distributor in the FixLJ-Dependent Regulatory Cascade for Control of Genes Inducible by Low Oxygen Levels **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v. 180, p. 5251–5255 , 1998.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio-Technology**, New York, US, v.10 p.413–417, 1992.

HOWIESON, J. G., AND EWING, M. A. Annual species of *Medicago* differ greatly in their ability to nodulate on acid soils. **Aust. J. Agric. Res.** Victoria, AU, v.40, p. 843-850, 1989.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R. A inoculação da soja. **Circular Técnica**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina, n. 34, p. 28, 1997.

HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain, legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Res.** Amsterdam, NL, v.65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p.9-89, 1994.

JARDIM-FREIRE, J.R.; COSTA, J.A.; STAMMEL, J.G. Principais fatores que propiciaram a expansão da soja no Brasil. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, RS, v.92, p.39-47, 2006.

JARDIM-FREIRE, J.R. & VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, RS, v.5, p.117-126, 1999.

JOERGER, R D., PREMAKUMAR, R., BISHOP, P.E. Tn5- induced mutants of *Azotobacter vinelandii* affected in nitrogen fixation under Mo-deficient and Mo-sufficient conditions. **J. Bacteriol.** Washington, US, v. 168, p. 673-682, 1986.

JORDAN, P. M. Highlights in haem biosynthesis. **Curr. Opin. Struct. Biol.** Londres, v. 4, p. 902–911, 1994.

KEEN, N.T. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, California, v.42, p.421-440, 1988.

KOSSLAK, R.M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H.E.; APPELBAUM, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated

from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, US, v.84, p.7428-7432, 1987.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, NY, v. 27, p. 95-125, 2006.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.38, p.501-505, 1992.

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, PA, v.22, p.37-78, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods** v. 25, p. 402–408, 2001.

LONG, S.R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **Plant Cell**, Rockville, Md., US, v.8, p.1885-1889, 1996.

MAPA, (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br>. Acesso em: 23 jun 2009.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”. **Comunicado Técnico** – EMBRAPA, Brasília, nº19, p.1-14, 1997.

MAURICE, S.; BEAUCLAIR, P.; GIRAUD, J.J.; SOMMER G.; HARTMANN, A.; CATROUX, G. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after long-term storage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, Inglaterra, v. 17, p. 635-643, 2001.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura. Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2001. Disponível em: http://www.fesbe.org.br/v3/?page=informacoes/ler&tipo=informacao_a&id=18. Acesso em: 23 jun 2009.

MESA, S.; BEDMAR, E.J.; CHANFON, A.; HENNECKE, H.; FISCHER, H.M. *Bradyrhizobium japonicum* NnrR, a Denitrification Regulator, Expands the FixLJ-FixK2 Regulatory Cascade. **J. Bacteriol.** Washington, US. V.185, 2003.

MONSON, E.K.; WEINSTEIN, M.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Washington, US, v. 89, 1992.

MURRY, M. A.; STIGTER, J.; BRUIN, F.J. PCR-based cloning and sequence analysis of a *fixL* homologue from *Frankia* species strain CeS15 *In*: R. PALACIOS, J. MORA, AND W. E. Newton (ed.), **New horizons in nitrogen fixation**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 485, 1993.

NELLEN-ANTHAMATTEN, D.; ROSSI, P.; PREISIG, O.; KULLIK, I. ; BABST, M.; FISCHER, H. M.; HENNECKE, H. *Bradyrhizobium japonicum* FixK₂, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. **J. Bacteriol.** Washington, US. v.180, p. 5251–5255, 1998.

NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v.22, n.2, p.143-166, 1965.

OKE, V.; LONG, S.R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, Inglaterra, v.2, p.641-646, 1999.

OLIVEIRA, L.A.; VIDOR, C. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, SP, v. 8, p. 49-55, 1984a.

OLIVEIRA, L.A.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. II. Capacidade competitiva por sítios de nódulos. **R. Bras. Ci. Solo**, Campinas, SP, v. 8, p. 43-47, 1984b.

PAAU, A.S.; BLOCH, C.B.; BRILL, W.J. Development fate of *Rhizobium meliloti* bacterioids in alfafa nodules. **J. Bacteriol**, Washington, US, v.143, p.1480-1490, 1980.

RODRIGUEZ, G. G.; PHIPPS, D.; ISHIGURO K.; RIDGWAY, H. F. Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 58, p. 1801-1808, 1992.

PERRET, X; STAEHELIN, C.; BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, US, v.64, p.180-201, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SCIOTTI, M.A.; CHANFON, A.; HENNECKE, H.; FISCHER, H.M. Disparate Oxygen Responsiveness of Two Regulatory Cascades That Control Expression of Symbiotic Genes in *Bradyrhizobium japonicum* **J. Bacteriol.** Washington, US, v. 185, p. 5639-5642, 2003.

SMITH, R.S. Legume inoculant formulation and application. **Can. J. Microbiol.** Ottawa, CA v. 38, p. 485- 492, 1992.

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.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

STOUGAARD, J. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, p. 531–540, 2000.

STREETER; J. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **J. Appl Microbiol** v.95, p.484-491, 2003.

TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford , v.13, p.389-393, 1981.

TREVORS, J. T. Electron transport system activity in soil, sediment, and pure cultures. **Crit. Rev. Microbiol.** Boca Raton, Fla. v. 11, p. 83-100, 1984

VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, Washington, US, v.59, p.124-142, 1995.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., ed. **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p.297-360, 1997.

VARGAS, M. A. T., AND GRAHAM, P. H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Res.** Amsterdam, NL, v. 19, p. 91-101, 1988.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. Fixação Biológica do nitrogênio. In: ARANTES, N.E. E SOUZA, P.I.M. (Ed.) **Cultura de soja nos cerrados**. Piracicaba: Patafos, p. 159-182, 1993.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C. & PERES, J.R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília, Embrapa, 84 p., 1994.

VASSE, J.; DE BILLY, F.; CAMUT, S.; TRUCHET, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacterioids and nitrogen fixation in alfafa nodules. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v.172, p.4295-4306, 1990.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 200p., 1970.

VOELCKER, J.A. "Nitragin" or the use of "pure cultivation" bacteria for leguminous crops. **J. Roy. Agr. Soc.** 3rd Ser. 7:253-264, 1986.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. **Neuroendocrinology** Basel, Suíça, v. 63, p. 397 – 407, 1996.

ZILLI, J.D.; CAMPO, R.J.; RIBEIRO, K. G.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLER, O.J.; HUNGRIA, M. Utilização de Inoculantes de *Bradyrhizobium* no Cultivo de Soja nos Cerrados de Roraima. **Circular Técnica**, n.2, p.1-9, 2005

ZIMMERMAN, R.; ITURRIAGA, R.; BECKER-BIRK, J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 36, p. 926-935, 1978.