

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
LINHAGENS MUTANTES DE *RHIZOBIUM TROPICI***

Hemelin Ludmila dos Santos

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

MAIO DE 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
LINHAGENS MUTANTES DE *RHIZOBIUM TROPICI***

Hemelin Ludmila dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Co-Orientadora: Dra. Tereza Cristina Luque Castellane

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

MAIO DE 2012

Santos, Hemelin Ludmila dos
S237a Avaliação do potencial biotecnológico de linhagens mutantes de
Rhizobium tropici / Hemelin Ludmila dos Santos. – – Jaboticabal, 2012
xiv, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, Danielle
Gregório Gomes Caldas
Bibliografia

1. qPCR. 2. Fixação biológica do nitrogênio. 3. Exopolissacarídeos.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 577.212.4

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

HEMELIN LUDMILA DOS SANTOS - nascida na cidade de Sorocaba (SP), em 11 de junho de 1984. Graduiu-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (UFGD/FCBA), Campus de Dourados (MS), no ano de 2007. Em 2010, ingressou no Curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, desenvolvendo sua dissertação junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) no Campus de Jaboticabal - SP.

"Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la"

Cícero.

“Exemplos de vida devem ser seguidos”

Ao meu pai Francisco Carlos dos Santos que sempre me incentivou.

DEDICO.

A minha mamãe Iraci T. Zagato dos Santos, pelo carinho e apoio, sempre com
palavras de amor e força.

Aos meus irmãos Michela M. dos Santos e Igor D. dos Santos.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre presente em minha vida, me fortalecendo;

Ao meu orientador Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza pela confiança depositada, pelos ensinamentos, amizade e dedicação durante esta trajetória;

À Dra Tereza Cristina Luque Castellane pela Co-orientação deste trabalho e pela delicadeza que demonstrou em nosso convívio;

À profa. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos por ceder seu laboratório e me acolher nesta grande equipe, o LBMP;

Ao Dr. João Carlos Campanharo e a profa. Dra. Lúcia Carareto Alves, pelas sábias palavras, sempre que necessário;

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela contribuição na dissertação;

Às amigas que dividem grande parte do seu tempo comigo Bruna Agy Loureiro, Marise Tanaka Suzuki e Carolina Nagib sempre pacientes;

À Ana Rita Lemes Nunes e Bruna Sousa Gonçalves que dividiram grandes momentos de descontração e carinho, e também me ouviram nos momentos difíceis, amo vocês;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP), sempre dispostos a ajudar;

Às amigas mais que especiais Karla C. Stropa, Gisele Rodrigues, Andressa de Souza, Viviane C. Vieira, Michele R. Persona, Elisângela Soares Gomes e Gabriela Cabral Fernandes, obrigada por tudo, por todo o carinho, apoio e pelas muitas risadas;

Ao Gustavo Claudiano pela contribuição e disposição em me ajudar, e também pelos momentos de descontração;

A toda minha família querida, minha mãe Iraci, meu pai Francisco, e meus irmãos Michela e Igor, seria impossível sem vocês ao meu lado;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo número 2010/13242-4) pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram não só para a realização deste trabalho, mais também para a minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Importância da Fixação Biológica do Nitrogênio para a cultura de feijão.....	3
2.2. Exopolissacarídeos (EPS) de origem rizobiana.....	7
2.3. Transposons.....	10
2.4. PCR em tempo real.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Amostras utilizadas.....	14
4.2. Cultivo Bacteriano.....	14
4.3. Análise da curva de crescimento.....	15
4.4. Isolamento de RNA total e síntese de cDNAs.....	16
4.5. Isolamento de Bacterióides para extração do RNA.....	17
4.6. PCR em tempo real - Construção dos Oligonucleotídeos iniciadores e descrição dos genes alvos e do controle endógeno utilizados na quantificação relativa.....	17
4.7. Validação dos Oligonucleotídeos iniciadores.....	18
4.8. Reação de PCR quantitativa.....	19
4.9. Análise dos dados e estudo da quantificação relativa.....	19
4.10. Avaliação da estimativa do número mais provável.....	20
4.11. Caracterização molecular da mutação.....	21
4.12. Bactérias e plasmídeos.....	21

4.13. Meios de Cultura, condições de cultivo das bactérias.....	21
4.14. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores para isolamento do gene <i>exoZ</i>	22
4.15. Extração de DNA genômico.....	22
4.16. Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA.....	23
4.17. Amplificação do gene <i>exoZ</i>	23
4.18. Purificação e clonagem dos insertos em vetor.....	24
4.19. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	25
4.20. Seleção dos clones.....	26
4.21. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	26
4.22. Sequenciamento e análise de DNA.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Curva de Crescimento.....	27
5.2. Qualidade do RNA total.....	32
5.3. PCR Real Time - Validação dos oligonucleotídeos iniciadores, eficiência de cDNA e curva de Dissociação.....	33
5.4. Reação de PCR Real Time.....	36
5.5. Número mais provável.....	40
5.6. Análise de DNA genômico e do produto <i>exoZ</i>	43
5.7. Clonagem do <i>exoZ</i> em vetor plasmidial.....	45
5.8. Sequenciamento e análise dos clones obtidos.....	46
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	18
Tabela 2: Densidade óptica 600 nm das estirpes selvagem e mutantes.....	29
Tabela 3: Pureza (valor da relação 260/280) e concentração do RNA.....	32
Tabela 4: Número mais provável.....	42
Tabela 5: Número de tubetes com presença de nódulos.....	42
Tabela 6: Sequências dos iniciadores para o gene <i>exoZ</i>	43
Tabela 7: Quantificação DNA genômico em espectrofotômetro NanoDrop.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios.....	6
Figura 2: Ilustração do vetor pGEM-T EASY (Promega).....	25
Figura 3: Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	29
Figura 4: Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> Mutante1, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	30
Figura 5: Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> Mutante2, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	30
Figura 6: Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> Mutante3, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	31
Figura 7: Curva de crescimento da estirpe <i>Rhizobium tropici</i> Mutante4, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.....	31
Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos cDNAs das estirpes SEMIA 4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4 nas fases log, estacionária e bacterióide.....	33
Figura 9: Perfil da amplificação do gene <i>exoZ</i> fase lag com 1000nM de oligonucleotídeo iniciador.....	34
Figura 10: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. Linha de base: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; Ct início da fase exponencial, onde a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).....	34
Figura 11: Curva de dissociação oligonucleotídeo iniciador <i>exoZ</i>	35

Figura 12: Curva de dissociação oligonucleotídeo iniciador <i>phbC</i>	36
Figura 13: Níveis de expressão do gene <i>nifH</i> em condições de bacterióide (em simbiose) das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	36
Figura 14: Níveis de expressão do gene <i>fixN</i> em condições de bacterióide (em simbiose) das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	37
Figura 15: Níveis de expressão do gene <i>phbC</i> em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	38
Figura 16: Níveis de expressão do gene <i>exoR</i> em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	38
Figura 17: Níveis de expressão do gene <i>exoZ</i> em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	39
Figura 18: A - Nódulos de plantas inoculadas com a estirpe mutante 4, B - Raiz planta inoculada com a estirpe SEMIA 4080, C - Nódulos desinfectados.....	41
Figura 19: A: Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B: Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% das amostras de DNA genômico das estirpes SEMIA 4080 e Mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	43
Figura 20: Figura: A: Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,0% das amostras de produto de PCR do gene <i>exoZ</i> das estirpes SEMIA 4080 e Mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.....	44
Figura 21: A - Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B -	

Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA plasmidial dos clones 1 a 10 da estirpe selvagem SEMIA 4080.....45

Figura 22: A - Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA plasmidial dos clones 1 a 4 da estirpe mutante 4080Ω3.....46

Figura 23: Identificação de similaridade de espécie das sequências das estirpes selvagem e mutante com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta Blastn.....47

Figura 24: Comparação das sequências das estirpes selvagem e mutante com as sequências depositadas no banco do NCBI através da ferramenta Blastx.....47

Figura 25: Alinhamento das sequências das estirpes selvagem e mutante por meio do programa ClustalW, juntamente com a sequência consenso. Contig4– sequência da estirpe selvagem e contig1 - sequência da estirpe mutante.....48

Figura 26: Alinhamento das sequências das estirpes selvagem e mutante através da ferramenta Blastn.49

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS MUTANTES DE *RHIZOBIUM TROPICI*

RESUMO

O feijoeiro desenvolve associação simbiótica nas raízes com a bactéria *Rhizobium tropici*, naturalmente ou via inoculação, propiciando a infecção das raízes da planta hospedeira e provocando a formação de nódulo onde ocorre a fixação do N₂. Os genes bacterianos envolvidos na formação dos nódulos estão divididos em: 1) genes que especificam a composição bioquímica da superfície celular bacteriana e 2) genes relacionados à produção de polissacarídeos. Estirpes de rizóbio são eficientes produtores de EPS, tais moléculas estão envolvidos nos processos de infecção e fixação biológica do nitrogênio (FBN). Estirpes mutantes dessa bactéria têm um papel importante não só na fixação biológica do nitrogênio, como também, biotecnologicamente. Neste trabalho foi realizada a caracterização do potencial biotecnológico de microrganismos mutantes em relação a sua estirpe selvagem SEMIA 4080, por meio da análise de expressão gênica, por PCR em tempo real, dos genes *fixN*, *nifH*, *exoZ*, *exoR* e *phbC*, relacionados ao processo de FBN. Foram selecionados quatro mutantes construídos por inserção de transposons Tn5. Para a avaliação da expressão gênica, o RNA foi extraído nas fases lag, log e estacionária de crescimento bacteriano e também na fase de bacterioides, isolados de nódulo de feijoeiro inoculados com as estirpes mutantes e selvagem. Os dados de seqüenciamento revelam que a mutação não ocorreu no gene *exoZ*, gene para o qual a mutação foi direcionada. A mutação aparentemente não alterou a expressão dos genes relacionados à FBN, no entanto, os mutantes apresentaram menor eficiência na simbiose. Sendo assim, tais mutantes são recomendados na utilização biotecnológica, uma vez que apresentam maior produção de exopolissacarídeos em relação a sua estirpe selvagem

Palavras chave: qPCR, fixação biológica do nitrogênio, exopolissacarídeos.

EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MUTANT STRAINS OF *RHIZOBIUM TROPICI*

SUMMARY

Plant bean develops symbiotic association with *Rhizobium tropici* bacteria both naturally or through inoculation, enabling the infection of roots of the host plant and triggering nodule formation where N₂ fixation takes place. The bacterial genes involved in the formation of the nodules are divided into two classes: 1) genes that specify the biochemical composition of the bacterial cell surface and 2) genes related to the production of capsular polysaccharides. *Rhizobia* strains are efficient producers of exopolysaccharides and such exudates present complex structure involved in processes of infection and biological nitrogen fixation (BNF). This work focused on the characterization of the biotechnological potential of mutants in relation to their wild type SEMIA 4080, through gene expression analysis by real time PCR, gene *fixN*, *nifH*, *exoZ*, *exoR* and *phbC*, related to the process of BNF. Four mutants selected were constructed by insertion of transposons Tn5. For the evaluation of gene expression, RNA was extracted phases lag, log and stationary, bacterial growth phase and also in bacteroids isolated from nodules of bean plants inoculated with the mutant strains and wild type. The sequencing data revealed that the mutation not occur in *exoZ* gene, the gene to which mutation was directed. The mutation apparently did not alter the expression of genes related to BNF, however, the mutants were less efficient in symbiosis. Thus, these mutant strains are recommended in the biotechnological utilization since a higher production of exopolysaccharides in relation to their wild type strain.

Keywords: qPCR, biological nitrogen fixation, exopolysaccharides.

1. INTRODUÇÃO.

Nos últimos anos, o Brasil tem ocupado o primeiro lugar na produção e consumo mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), considerado um dos alimentos básicos e uma das principais fontes de proteína na alimentação da população brasileira. Entre os diversos tipos de grãos do feijoeiro, merece destaque o tipo carioca, que representa 70% do mercado consumidor brasileiro (DEL PELOSO & MELO, 2005). A produção nacional de feijão Primeira Safra, alcançou 1.374,2 mil toneladas, um pouco menor que a safra de 2010. A instabilidade dos preços, a baixa liquidez, os estoques do produto e os problemas climáticos, fizeram os produtores migrarem parte da lavoura para outros cultivos (CONAB, 2010).

Em razão da importância econômica e social do feijoeiro no Brasil e da potencialidade e necessidade de incrementar sua produtividade, estudos visando à otimização do processo de nodulação, e, conseqüentemente, da fixação biológica do nitrogênio, como forma de melhorar a disponibilidade de nutrientes às plantas, é uma prática de grande importância e muito necessária (FRANCO et al., 2001).

O gênero *Rhizobium* está descrito na Classe das α -Proteobactérias, da ordem Rhizobiales e na família Rhizobiaceae, segundo a edição de 2003 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. O Gênero *Rhizobium* é definido como um grupo de espécies que podem ter tanto flagelos peritríquios ou subpolares, rápido crescimento, produção de ácido em meio YMA, e incluem estirpes que possuem a habilidade de fixação simbiótica de nitrogênio. Vinte e uma espécies estão atualmente descritas no Gênero *Rhizobium*: *R. Arachi*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. phaseoli*, *R. Sullae*, *R. taenense*, *R. tropici*, *R. undicola* e *R. yanglingense* (KUYKENDALL et al., 2003). *R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardini*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* podem ainda ser divididos em vários subgrupos e variedades com base na especificidade pelo hospedeiro (SAWADA et al., 2003).

Inicialmente, a simbiose com o feijoeiro era considerada bastante restrita, sendo relatado que ocorreria apenas com um grupo de bactérias classificadas inicialmente como *Rhizobium phaseoli* (FRED et al., 1932) e, posteriormente, reclassificadas como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984). Contudo, o avanço nas metodologias de biologia molecular e a coleta desses microrganismos em vários locais do mundo indicaram que essa leguminosa pode ser bastante promíscua em suas associações simbióticas (HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995; MICHIELS et al., 1998), resultando na descrição de quatro novas espécies: *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* bv. *phaseoli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum* (bv. *gallicum* e bv. *phaseoli*) e *R. giardinii* (bv. *giardinii* e bv. *phaseoli*) (AMARGER et al., 1997).

Dentre as espécies de *Rhizobium* fixadores de nitrogênio, a maioria das estirpes isoladas nos solos brasileiros pertence à espécie *R. tropici*, demonstrando sua enorme adaptabilidade às condições destas regiões (HUNGRIA et al., 2000). Esta espécie é mais estável metabolicamente e mais tolerante a estresses, como por exemplo, temperatura elevada e acidez do meio (GRAHAM, 1992).

Para que ocorra a invasão bacteriana e a formação dos nódulos contendo os bacterióides fixadores de N_2 , resultado do fenótipo Fix^+ , é necessário que haja uma perfeita interação entre a planta hospedeira e o micro-simbionte durante uma série de etapas sequenciais. Inicialmente o rizóbio é atraído até as raízes da planta hospedeira, numa série de eventos pré-infecção. Neste estágio inicia-se a comunicação molecular entre a planta e bactéria, quando são decifrados pela bactéria os códigos enviados pela planta hospedeira. Este código é composto de diferentes substâncias exsudadas pelas raízes das plantas, como carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides) que irão compor um gradiente químico na rizosfera, resultando na atração da bactéria até a superfície radicular e na indução dos fatores de nodulação bacterianos (FRAYSSE et al., 2003).

Embora uma série de etapas sequenciais venha sendo estudada há décadas, recentemente, foi elucidado que uma infecção com sucesso requer uma

complexa troca de moléculas de carboidratos produzidos pelo microssimbionte, incluindo o exopolissacarídeo (EPS), lipopolissacarídeo (LPS), o lipo-oligossacarídeo (LOS) ou oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs), denominados de Fatores Nod, incluindo ainda outros do tipo polissacarídeo capsular (CPS), polissacarídeo nodular (NPS) e a β -glucana cíclica (BECKER & PÜHLER, 1998; FRAYSSE et al., 2003; SHORUPSKA et al., 2006). Dentre estes, os EPSs ou oligossacarídeos derivados dele são constituintes normais de todas as células microbianas, sendo fundamentais durante os eventos de pré-infecção e formação dos nódulos radiculares (BECKER & PÜHLER, 1998).

Em trabalho anterior, mutantes no gene *exo* envolvidos na síntese das subunidades repetitivas do EPS de *Rhizobium tropici*, foram construídos no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FAPESP, Processo 2007/57586-6) e foram gentilmente cedidos para este estudo. No presente estudo foi realizada a caracterização molecular de mutantes em relação a sua estirpe selvagem SEMIA 4080, por meio da avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real, de alguns dos genes relacionados ao processo de nodulação e fixação biológica do nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da Fixação Biológica do Nitrogênio para a cultura de feijão.

O feijão *Phaseolus vulgaris* (L.) é originado provavelmente da região do continente Americano, de onde se espalhou para outros continentes no século XV, logo após o descobrimento da América (GALLO & MIYAZAKA, 1961). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial. Estima-se que a produção nacional deve chegar a 3,8 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (MAPA, 2011). O feijão é uma boa fonte de calorias, vitaminas e minerais, como fósforo, potássio, cálcio e magnésio (SGARBIERI, 1987).

Apesar da produção do feijão apresentar grande importância econômica, pouco se sabe sobre a taxonomia das estirpes utilizadas para a inoculação desta

leguminosa (FUKAGAWA et al., 1975; SCAMPARINI et al., 2000). Em relação à classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro, até 1984, estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984). Desde então, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma grande diversidade genética entre os micro-simbiontes, permitindo, assim, a definição de novas espécies: *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991) *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997), existindo, ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, que podem representar novas espécies (EARDLY et al., 1995).

A maioria dos rizóbios isolados nos solos brasileiros pertence à espécie *R. tropici*, e demonstra sua enorme adaptabilidade às condições edafoclimáticas destas regiões (HUNGRIA et al., 2000). Esta espécie é mais estável metabolicamente e mais tolerante a estresses, como, por exemplo, temperatura elevada e acidez do meio (GRAHAM, 1992), frequentemente utilizada na fabricação de inoculantes para a cultura de feijão e recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA.

No processo de fixação do nitrogênio, as plantas, em sua grande maioria leguminosas, estabelecem uma relação simbiote com bactérias fixadoras de nitrogênio para converter o nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3) (TAIZ & ZEIGER, 2004). A demanda de nitrogênio para as plantas depende da decomposição da matéria orgânica ou da adubação nitrogenada, no entanto o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico ocorre naturalmente no solo com microrganismos de vida livre ou em associação com espécies vegetais. A simbiose de plantas leguminosas com os diferentes gêneros de rizóbios parece ser o sistema que mais contribui em termos de incorporação do N_2 fixado à rizosfera (YAMADA et al., 1988).

O processo de assimilação do nitrogênio, por absorção radicular, requer uma série complexa de reações bioquímicas, que estão entre as reações de maior demanda energética dos organismos vivos. Na assimilação do nitrato (NO_3^-), o nitrogênio desse composto é convertido em uma forma mais energética, o nitrito

(NO_2^-) e, então, em uma forma ainda mais energética, o amônio (NH_4^+), e finalmente em nitrogênio-amida da glutamina. Por outro lado, a FBN renova todo o nitrogênio contido na biosfera, compensando as perdas que ocorrem com a desnitrificação e o torna disponível para ser metabolicamente utilizável (BERKUN & BOHLOOL, 1980).

O complexo enzimático denominado nitrogenase é responsável pela fixação do nitrogênio (POSTGATE, 1982). Este complexo é formado por duas metaloenzimas com características estruturais diferentes (DIXON & KAHN, 2004) e são denominadas de acordo com sua composição metálica: a proteína ferro, ou dinitrogenase redutase (subunidades codificadas pelo gene *nifH*), e a proteína ferro-molibdênio ou dinitrogenase (subunidades codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*) (EADY et al., 1986). O processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado: tanto na atividade da nitrogenase, como na expressão de seus genes em resposta a disponibilidade de nitrogênio e oxigênio do meio (POSTGATE, 1982; DIXON & KAHN, 2004).

O feijoeiro desenvolve associação simbiótica quando a bactéria está presente no solo, naturalmente ou via inoculação, a qual reconhece e infecta as raízes da planta hospedeira provocando a formação de nódulos, onde ocorre a fixação do N_2 (HUNGRIA et al., 1997). O processo de nodulação pode ser simplificadamente ilustrado por meio da Figura 1.

Dentro do nódulo as bactérias transformam-se em bacterióides. Estes tornam o nitrogênio disponível às plantas, através da redução do nitrogênio atmosférico, catalisada pela enzima nitrogenase. A nitrogenase é considerada a enzima mais estudada nos nódulos, estando diretamente relacionada com a eficiência da FBN, e ocorre somente em organismos procariotos. Portanto, a atividade da nitrogenase, assim como rendimento de grãos, conteúdo de proteínas e aminoácidos são parâmetros monitorados para avaliar a eficiência da fixação por bactérias (ALBERHEIN et al., 1967; GIDLEY et al., 1991).

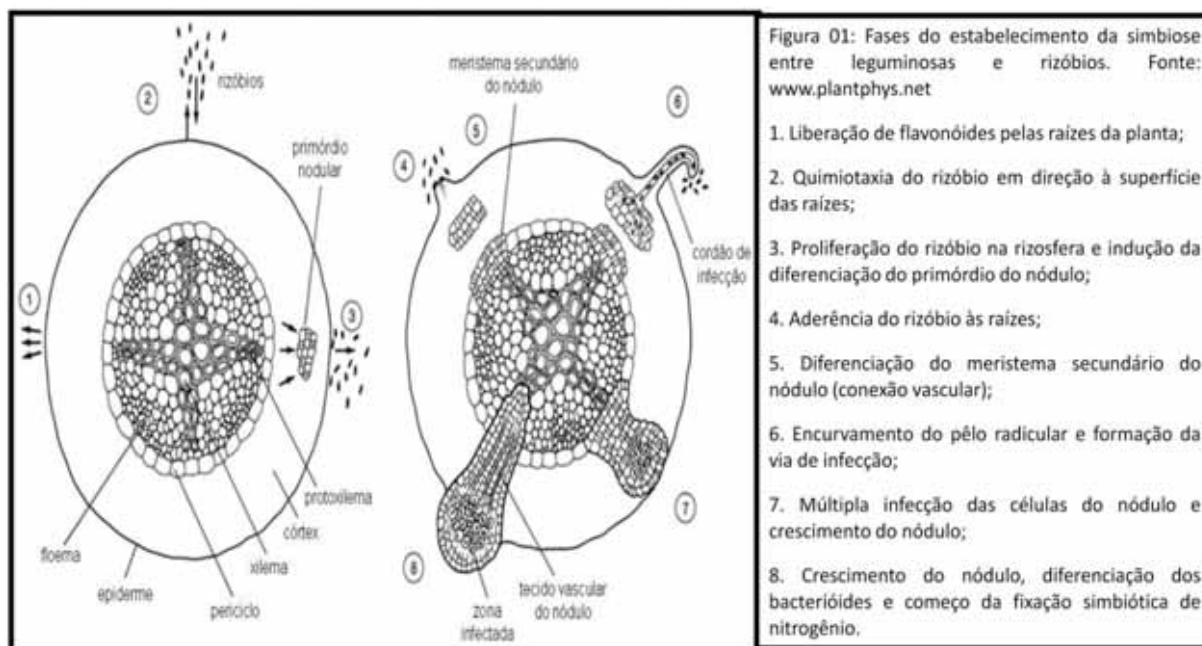


Figura 1: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios.

Os genes bacterianos envolvidos na formação dos nódulos estão divididos em duas classes. A primeira corresponde aos genes que especificam a composição bioquímica da superfície celular bacteriana, tais como os que determinam a síntese de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos, genes *exo* e *lps*, respectivamente, e polissacarídeos capsulares, antígenos K e β -1,2-glucanos e genes *ndv* "nodule development". Estes genes estão envolvidos na determinação da especificidade ao hospedeiro e formação do cordão de infecção. A segunda classe consiste nos genes envolvidos diretamente na infecção e nodulação, genes *nod*, *nol* e *noe*, os quais, além do reconhecimento ao hospedeiro, são responsáveis pela síntese enzimática de fatores Nod que induzem à formação do nódulo (LONG, 1996).

Com a ativação dos genes *nod* dos rizóbios, ocorre uma troca de sinais moleculares, onde as bactérias emitem sinais específicos para o hospedeiro, que induz algumas modificações radiculares, como a deformação e o aumento no número dos pêlos radiculares, levando à formação de nódulos. Após as

modificações radiculares, ocorre a dissolução das paredes celulares, formando um cordão de infecção que propicia a entrada das bactérias nos nódulos, as quais se diferenciam, transformando-se em bacteróides. Atuam, então, as enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do N_2 e com a assimilação do nitrogênio fixado (CRAWFORD & GLASS, 1998).

Outro conjunto de genes, relacionados à fixação biológica do nitrogênio, e que estão 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 nitrogenase, cofatores e transporte de elétrons (FISCHER, 1994). Contudo, uma cascata de genes está relacionada nos eventos de simbiose e fixação biológica de nitrogênio.

Várias considerações apontam a prática da fixação biológica do nitrogênio (FBN) como alternativa para reduzir os custos de produção e para diminuir o uso de insumos nitrogenados. Além de financeiramente atraente, tal técnica oferece uma alternativa ecológica na redução dos impactos adversos causados pela aplicação excessiva de fertilizantes (BROEK et al., 1998; BECKER et al., 1995; GIDLEY et al., 1991).

2.2. Exopolissacarídeos (EPS) de origem rizobiana.

A indústria do ramo de alimentos e farmacêuticos vem há vários anos, utilizando alguns EPS produzidos por bactérias no desenvolvimento de produtos com características de origem biológica de obtenção rápida e barata (SUTHERLAND, 1998). Estirpes de rizóbio são eficientes produtores de exopolissacarídeos (CASTELLANE & LEMOS, 2007) que podem ser aplicados na indústria de alimentos e farmacêutica, e de polihidroxialcanoatos (TRAINER & CHARLES, 2006), polissacarídeos que tem aplicação na produção de plásticos biodegradáveis.

Rhizobium e outros gêneros de bactérias podem sintetizar dois ou mesmo três polímeros extracelulares, juntamente com oligossacarídeos intracelulares, ainda que a síntese dessas moléculas possa não ser expressa simultaneamente.

As espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente produtoras de EPS (BECKER & PÜHLER, 1998). Dentre essas, as espécies pertencentes às famílias Rhizobiaceae e Phyllobacteriaceae sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares (BECKER & PÜHLER, 1998; CASTELLANE, 2004; CASTELLANE, 2007).

Como a maioria das pesquisas com esses microrganismos restringe-se a estudos de genética e a interação simbiótica, não há um produto comercial dos polímeros de origem rizobiana, apenas há relatos de produção de exopolissacarídeos com o nome de succinoglicana (também denominado como EPSI) e galactoglicana (denominado como EPSII) produzidos pela espécie *Sinorhizobium meliloti* (SUTHERLAND, 2001).

A composição química de um número considerável de EPS rizobianos já foi determinada (REINHOLD et al., 1994; BECKER & PÜHLER, 1998; CASTELLANE, 2004; CASTELLANE, 2007). Entretanto, a heterogeneidade da composição de EPSs produzidos por rizóbios ficou demonstrada em estudos com 26 estirpes padrões de rizóbio pertencentes a diferentes espécies (CASTELLANE, 2004). Como o EPS varia muito em sua composição, conseqüentemente, varia em suas propriedades físicas, químicas e estruturais (SUTHERLAND, 2001).

A diversidade de estruturas apresentadas pelas moléculas de exopolissacarídeos é refletida pela diversidade de enzimas responsáveis pela sua síntese (SHORUPSKA et al., 2006). Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, e o avanço no seqüenciamento de genomas, uma nova abordagem na elucidação de funções gênicas foi contemplada. A eliminação de um determinado gene no genoma é uma estratégia muito útil para estudar a função biológica desse mesmo gene na célula. A eliminação de um gene e a subsequente análise da alteração do seu fenótipo original é uma prática comum em rizóbios, com base na recombinação homóloga, um mecanismo que ocorre naturalmente *in vivo* (MOREIRA et al., 2000; SHORUPSKA et al., 2006).

Na literatura há poucas informações sobre o processo de biossíntese dos diferentes tipos de EPS. Contudo, diversos estudos demonstraram que nas bactérias Gram-negativas os EPSs são sintetizados intracelularmente, utilizando açúcares difosfato nucleotídeos, que fornecem as formas ativadas de monossacarídeos, fornecendo à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (SUTHERLAND, 2001). Este processo é muito complexo, regulado tanto por níveis transcricional como pós-traducional, e dependente da atividade de um complexo de proteína, ambos localizados nas membranas interna e externa, abrangendo o espaço periplasmático entre elas (MOREIRA et al., 2000; SHORUPSKA et al., 2006).

Os EPS exsudados pelas células rizobianas apresentam estrutura complexa e também estão envolvidos nos processos de infecção e FBN. A formação do biofilme é fundamental para o sucesso do processo de infecção e depende dos exopolissacarídeos rizobianos. GONZALES et al.(1996) demonstraram que mutantes de *Sinorhizobium meliloti* que eram incapazes de produzir EPS, não eram capazes de infectar a *Medicago sativa*. WANG et al.(2008) avaliando diversas linhagens de mutantes obtidos através da inserção de transposon Tn5, em *Mesorhizobium tiashanense*, demonstraram que as linhagens incapazes de produzir EPS abundantemente também não formavam biofilme e não eram capazes de nodular a sua hospedeira de origem.

Mutantes de *Rhizobium* sp. NGR234 deficiente na síntese de EPS formam goma em colônias crescidas em placas de Agar, no entanto perderam a capacidade de induzir a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em *Leucaena leucocephala* (fenótipo Fix⁻). Em vez disso, pequenos nódulos vazios (pseudo-nódulos) foram formados (CHEN et al., 1985). Um determinado número de genes de NGR234 envolvidos na síntese de EPS tem sido identificado em um cluster *exo* (CHEN et al., 1988; GRAY et al., 1990; ZHAN et al., 1990), já sequenciado (STREIT et al., 2004).

As leguminosas apresentam mecanismos de defesa à infecção de células rizobianas similares aqueles apresentados pelas plantas quando infectadas por bactérias patogênicas. Os EPSs de membrana desempenham a função de proteger as células bacterianas dos danos causados pelos mecanismos de defesa além de ser capaz de proporcionar o papel de reconhecimento da célula bacteriana pelo vegetal (MORGATE et al., 2005; MORGANTE et al., 2007; STAEHELIN et al., 2006). Rizóbios deficientes na capacidade de produzir EPS de membrana apresentam deficiência na capacidade de infectar o hospedeiro, além de serem mais susceptíveis aos danos celulares causados pelos mecanismos de defesas vegetais (MORGANTE et al., 2007; STAEHELIN et al., 2006).

2.3. Transposons.

Os transposons são elementos genéticos capazes de se movimentar de um lugar para outro no DNA, por um mecanismo denominado transposição. Uma vez que o transposon codifica suas próprias enzimas envolvidas no evento de transposição, este elemento não perde sua capacidade de movimentação ao se deslocar (GREEN, 2012). Existem em praticamente todos os organismos, porém, a ação dos transposons é melhor compreendida em bactérias, organismos cuja evolução se deve, em grande parte, a estes elementos (SNYDER & CHAMPNESS, 2003; LEWIN, 2009; SIEFERT, 2009).

Há dois tipos básicos de transposons: o primeiro tipo foi descrito por Barbara McClintock na década de 1940; os elementos dessa categoria foram denominados *Ac/Ds* codificam um ou dois genes necessários para o elemento transponível. Eles também contêm sequências repetidas invertidas de aproximadamente 10 pb que flanqueiam as sequências codificadoras. Estes elementos repetidos invertidos são reconhecidos pela transposase, uma enzima codificada por certos elementos transponíveis. Os transposons se ligam com essas sequências repetidas invertidas e integram os elementos transponíveis no sítio alvo. A segunda categoria consiste principalmente dos retrotransposons, que provavelmente têm origem viral. Eles se parecem com estruturas deixadas por tumores de vírus de RNA e fazem a transposição como um intermediário de RNA.

Uma das proteínas codificadas pelo retrotransposon é a transcriptase reversa, que é a enzima necessária para sintetizar o DNA tendo como molde RNA (BUCHANAN et al., 2000; SOUSA et al., 2010).

A inserção de um transposon em um gene pode impedir sua expressão, principalmente se essa ocorre em um gene codificador de uma proteína. A expressão desse gene é normalmente bloqueada. Se a inserção de um transposon ocorrer nas regiões reguladoras de um gene, essa inserção pode ocasionar mudanças nos locais onde esse gene é normalmente expresso, em diferentes tecidos ou órgãos, ou ela pode afetar o nível de expressão desse gene (LORENZO et al., 1990; AHMED, 2009).

Do mesmo modo é importante o fato de que, ao inserir-se em um novo local do genoma, o mecanismo utilizado na transposição promove a duplicação de uma pequena região do DNA - alvo nas duas regiões adjacentes às repetições terminais. Essas seqüências duplicadas normalmente permanecem no DNA após a excisão do transposon. Se o elemento de transposição está inserido em uma região codificadora de um determinado gene, a presença dessas seqüências duplicadas pode interferir na fase de leitura ou adicionar códons extras à seqüência gênica, causando mutações (AHMED, 2009).

A inserção de um transposon em um gene, entretanto, frequentemente impede a expressão do mesmo por uma questão probabilística ligada à degenerabilidade do código genético. Porém, pode também ocorrer a geração de novas cópias gênicas, repetidas *in tandem*, de acordo com o comportamento do transposon no genoma, ocasionando ganhos de função gênica.

No sistema replicativo de transposição Tn5 uma nova cópia do elemento transponível é gerada no evento da transposição, o resultado é que uma cópia permanece no local original do elemento, enquanto a outra é integrada em uma nova posição genômica (AHMED, 2009).

2.4. PCR em tempo real.

As técnicas de biologia molecular e a engenharia genética progrediram muito nas últimas décadas, em especial a partir da década de 60, após a descrição da estrutura tridimensional do DNA por Watson e Crick (FAPESP, 2003).

A reação em cadeia de polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) é uma técnica muito empregada nos estudos da biologia molecular, utilizada para amplificar um fragmento de ácido nucléico específico. A especificidade da PCR é baseada no uso de oligonucleotídeos iniciadores, também denominados de oligonucleotídeos iniciadores, que são complementares às regiões que flanqueiam o fragmento a ser amplificado.

A PCR foi inicialmente proposta por GHOBIND KHORANA et al. (1971), mas diversos elementos necessários para a reação, em particular a DNA Polimerase termoestável, ainda não tinha sido descoberta naquela época.

Em 1985, Kary Mullis (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004) desenvolveu a estratégia para se amplificar um alvo genômico mediante a replicação do DNA *in vitro*. Esta técnica, denominada PCR, é executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células, possibilitando a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima *Taq* DNA polimerase. Quando um par de oligonucleotídeos iniciadores se liga ao DNA alvo, a enzima *Taq*-DNA polimerase sintetiza uma sequência complementar de DNA, a partir da extremidade 3'-OH livre do oligonucleotídeo iniciador. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Muitos métodos têm sido descritos para a análise quantitativa de seqüências de ácidos nucléicos (SHARP et al., 1980; THOMAS, 1980). Recentemente, a PCR tem se mostrado uma ferramenta poderosa para análise de ácidos nucléicos quantitativos. PCR e transcriptase reversa ((RT)-PCR) permitiram a análise de quantidades mínimas a partir dos ácidos nucléicos, isso, tem possibilitado muitas experiências que não poderiam ter sido realizadas com métodos tradicionais (VALASEK & REPA, 2005).

Em 1992, HIGUCHI e colaboradores adaptaram e desenvolveram a técnica de PCR em tempo real. Com este avanço biotecnológico, análises clínicas, agropecuárias e científicas podem ser realizadas com maior rapidez e precisão.

Esta técnica difere da PCR convencional por utilizar sondas marcadas com fluoróforos que emitem uma fluorescência durante as amplificações, e o sinal é detectado por um laser do termociclador. O resultado pode ser visualizado em uma tela de computador. As sondas mais utilizadas são TaqMan[®], Molecular Beacons e o corante intercalante SYBR[®] Green (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; BIEDERMANN et al., 2004)

A PCR convencional pode ser considerada o método mais sensível disponível. Devido à alta sensibilidade do método de PCR podem ocorrer resultados falso-positivos ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado (PALAZZI et al., 2000). Esta restrição pode ser evitada com o uso da PCR em tempo real (BIEDERMANN et al., 2004; NELSON et al., 2000). A técnica PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, possibilitando maior facilidade na quantificação, maior sensibilidade, precisão e maior velocidade na análise (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Diante do panorama apresentado, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação do potencial biotecnológico de microrganismos mutantes em relação a sua estirpe selvagem SEMIA 4080, avaliando-se a expressão gênica por meio de PCR em tempo real, de alguns dos genes relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio.

3.2. Objetivos específicos.

- Determinar a curva de crescimentos das estirpes selvagens e mutantes de *R. tropici* SEMIA 4080;
- Avaliar por meio do método da extinção por diluição (NMP) a presença ou ausência dos micro-simbiontes em plantas de feijoeiro inoculadas com as respectivas estirpes selvagens e mutantes;

- Quantificação relativa da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes *exoZ*, *exoR*, *phbC*, *nifH* e *fixN*;

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Amostras utilizadas.

Foram utilizadas as linhagens de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 e quatro mutantes; 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4, pertencentes ao banco de mutantes existente no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal/SP, construídos por CASTELLANE (2011).

4.2. Cultivo Bacteriano.

As estirpes foram cultivadas em meio RDM “*Rhizobium* Definied Medium” (BISHOP et al., 1976) modificado, com pH 6,8. Os meios de cultivo das estirpes mutantes foram suplementados com antibiótico Canamicina na concentração de 30 µg/mL.

RDM constituído por: K_2HPO_4 – 0,23 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,10 g/L, Glutamato Na_2H_2O – 1,10g/L, Elementos traços – 1000µL e Sacarose – 10g/L. Elementos traços: $CaCl_2$ – 5g/L, H_3PO_4 – 145mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 125mg/L, $CaSO_4 \cdot 7H_2O$ – 70mg/L, $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5mg/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 4,3mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 108mg/L e $NaMoO_4$ – 125mg/L.

Os meios de cultivo foram esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121⁰C por um período de 20 minutos.

As colônias foram repicadas em placas de Petri semanalmente, através de passagens para placas contendo meio fresco. Para preservar as estirpes foram preparados criotubos, contendo 800 µL de inóculo e 200 µL de glicerol armazenados em freezer -80⁰C. Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica.

Para a realização da curva de crescimento e extração do RNA as estirpes foram cultivadas em erlenmeyers de 125 mL, contendo 60 mL de meio de cultivo RDM e 60 µL de inóculo bacteriano. O inóculo foi padronizado com DO (densidade óptica) referente a 0,25 nm para a inoculação no meio. As culturas foram submetidas à agitação constante a 160 rpm, 28°C.

4.3. Análise da curva de crescimento.

Para análise do desenvolvimento da cultura bacteriana foi realizada a curva de crescimento das bactérias monitorando-se seu cultivo por meio da leitura da absorbância na densidade óptica de 600 nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Uniscience).

Esta análise foi realizada em triplicata a partir do preparo de um pré-inóculo inicial de cada estirpe. Para a diminuição dos efeitos de possíveis células mortas, as bactérias cultivadas em meio sólido foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 03 dias após plaqueamento inicial, através da raspagem da massa bacteriana com o auxílio de alça de platina. A massa bacteriana correspondente a uma alçada foi recuperada da placa e diluída em 15 mL de meio TY "Tryptone-Yeast Medium" (BERINGER, 1974), constituído de: 5 g/L de Triptona, 3 g/L de Extrato de Levedura, 0.87 g/L de Cloreto de Cálcio Dihidratado e pH ajustado para 7.0. O meio de cultivo das estirpes mutantes foi suplementado com canamicina em uma concentração de 30µg/mL. A turbidez do pre-inóculo foi registrada através da leitura da absorbância, em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Uniscience) correspondente à DO 600 de 0, 250 nm. A leitura do branco foi feito com o TY puro.

Aos 60 mL de meio RDM foram inoculados com 60 µL do pré inoculo e a DO 600 da cultura foi medida neste primeiro instante (tempo zero). Após a inoculação, os frascos foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital, a 140 rpm por 192 horas a 28°C. Para avaliar o estabelecimento inicial, foi feita a verificação de crescimento a cada hora (até aproximadamente 6h), e para a curva total, a cada 12 horas de cultivo.

Para estudo da curva de crescimento, foi utilizado um modelo matemático descrito abaixo:

$$y = \frac{P_1}{1 + e^{-P_2}} + \exp(P_4 + P_5 x + P_6 x^2)$$

onde:

y: representa o crescimento das estirpes;

P₁, P₂, P₃, P₄, P₅ e P₆: são os parâmetros utilizados em cada curva;

x: tempo em horas.

As curvas foram geradas utilizando o programa Origin versão 6.0 (Microcal Software Inc., 1999).

4.4. Isolamento de RNA total e síntese de cDNAs.

Para extração do RNA bacteriano, as células foram coletadas a partir das condições cuja expressão gênica se quer avaliar, seja “*in vitro*” ou isolados de nódulos de feijoeiro inoculados. A suspensão de células foi centrifugada a 4600xg, 10 min, 4°C. As células foram lisadas com 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) e clorofórmio, conforme descrito pelo fornecedor. O RNA foi precipitado com isopropanol e redissolvido em água. A avaliação da qualidade do RNA isolado foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante, contendo 18% (v:v) de formaldeído 37%. A pureza do RNA foi verificada por meio da leitura das absorbâncias 260/280 no espectrofotômetro NanoDrop.

Para obtenção dos cDNAs, 2 µg de RNA total de cada amostra foi misturado a 4 unidades de RNAsin (Promega), inibidor de RNase e 1,5 µg de “random hexamer oligonucleotídeos iniciadores”, pd(N)₆ (Amershan Bioscience). A mistura foi incubada a 70°C por 10 min e rapidamente resfriada a 4°C. A amostra de RNA foi misturada com 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), em reações de 20 µL. A síntese do cDNA foi efetuada a 40°C durante 1:30h.

4.5. Isolamento de Bacterióides para extração do RNA

O isolamento de bacterióides dos nódulos foi efetuado conforme metodologia descrita por CHOHAN & 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 a semeadura. A extração de RNA procedeu-se com 4 gr. de nódulo por amostra, seguiu-se o protocolo de extração já descrito no item 4.

4.6. PCR em tempo real - Construção dos Oligonucleotídeos iniciadores e descrição dos genes alvos e do controle endógeno utilizados na quantificação relativa.

Foram selecionados cinco genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio para análise. As sequências FASTA foram obtidas do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), contendo sequências genômicas de organismos filogeneticamente próximos ao *Rhizobium tropici*. Os oligonucleotídeos iniciadores foram construídos pelo alinhamento das sequências com o programa Clustalx. Foi gerada uma sequência consenso e parte desta foi selecionada e submetida ao programa “Oligonucleotídeo iniciador Express software”, versão 2.0 (Applied Biosystems Foster City, EUA). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela “Bioneer Oligo Synthesis”. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para cada gene estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador
<i>nifH</i>	F-5'GATGCCCCTGGCGATATTG3' R-5'CGTCATGTCCGGCGAGAT3'
<i>fixN</i>	F-5'GCCAAGGTGCGTACGAAA3' R-5'ACCTCTGGCTCGTGATCGTT3'
<i>phbC</i>	F-5'TGTGGGTTGGTAGCGATGAA3' R-5'GCGGGATTCTACGTGAAGCA3'
<i>exoZ</i>	F-5'CCATCATCCTTTTCTGCCGTAT3' R-5'ATGATCGGATCGCCGTAGAAT3'
<i>exoR</i>	F-5'AGGTGGCGTCAGCAAGGA3' R-5'GCTTTGAAGCCGAAGTTGAAGA3'
<i>sigmaA</i>	F-5'AGGCGAAGGACAAGGAAAAAG3' R-5'GGCGCGTCCTGGGAAT3'

O fator sigma A (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 PCR real time.

4.7. Validação dos Oligonucleotídeos iniciadores

A análise dos oligonucleotídeos iniciadores deu-se pela realização de reações contendo 200, 400, 800 e 1000 nM dos mesmos. Após análise, a concentração de 1000 nM foi a que apresentou a melhor amplificação tendo em vista o Ct que ocorrem as detecções.

Para a validação da concentração do cDNA, foi efetuada uma titulação nas concentrações [1x], [0,75x], [0,5x], [0,25x] e [0,1x] por meio da diluição seriada da amostra original da transcrição reversa, sendo que a quantidade de 3 µL do cDNA sintetizado sem diluição foi o que apresentou melhores resultados associados a 1000 nM de oligonucleotídeo iniciador. A normalização dos títulos se deu em função da concentração inicial de RNA utilizado para confecção do cDNA, como indicado para análises de expressão gênica pela técnica relativa.

Foi então realizada uma reação quantitativa absoluta em tempo real, os cDNAs obtidos foram utilizados em uma reação de 25 µL, na presença de 1000 nM dos pares de oligonucleotídeos iniciadores e *SYBR Green Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

4.8. Reação de PCR quantitativa.

O experimento de quantificação relativa foi executado em placas óticas 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 (pareamento / extensão e captação da fluorescência). A reação quantitativa relativa em tempo real foi realizada com 3µL dos cDNAs obtidos em uma reação de 25 µL, na presença de 1000 nM dos pares de oligonucleotídeos iniciadores e *SYBR Green Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações independentes foram realizadas em triplicata. Foram realizadas as reações nas mesmas condições tanto para os genes alvo como para o controle endógeno, de forma independente.

4.9. Análise dos dados e estudo da quantificação relativa.

A análise dos dados gerados e quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foram executadas através do programa *RQ Study* (Applied Biosystems), inerente ao equipamento ABI 7500. O programa utiliza o método comparativo do Ct (*threshold cycle*) de quantificação relativa baseada no algoritmo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que gera

o valor da expressão do gene alvo, normalizada pelo calibrador endógeno (*ABI Prism 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2*). O ajuste da linha de base e do *threshold* podem ser automaticamente determinados. Para construção dos gráficos dos níveis de expressão gerados pelo *RQ Study*, foi utilizado o programa “GraphPad Prism versão 5.01”.

4.10. Avaliação da estimativa do número mais provável.

A avaliação foi realizada em condições axênicas, isto é, na ausência de outros microrganismos, em casa de vegetação, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP. As sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), cv. IAC - Carioca foram desinfectadas superficialmente pela ação de etanol 95%, durante 1 minuto e água sanitária 1,5% por 6 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, em torno de seis vezes por 1 minuto cada, as sementes então foram semeadas.

O cultivo das plantas foi realizado em tubetes contendo vermiculita como substrato de plantio. O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a uma temperatura de 121⁰C e pressão de 1,5 atmosferas, durante 40 minutos. A semeadura ocorreu na densidade de três sementes por tubete. Sete dias após a semeadura, foi feito o desbaste, deixando-se uma plântula por tubete.

A inoculação sucedeu-se no mesmo dia da semeadura, foi aplicado 1 mL/semente das suspensões bacterianas em meio RDM (BISHOP et al., 1976) nas diluições de 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸. Todos os tratamentos receberam solução nutritiva sem nitrogênio aplicada semanalmente (GIBSON, 1987), em volume de 10 mL por tubete, e a irrigação foi realizada com água destilada. As plantas não inoculadas foram utilizadas como controle.

Após o período de 35 dias as plantas foram coletadas e lavadas. Foi realizada a verificação de presença ou ausência de nódulos por meio de análises visuais e contagem dos mesmos.

4.11. Caracterização molecular da mutação.

Para a caracterização da mutação foi escolhido o mutante 4080Ω3, o qual obteve maior expressão do gene para o qual a mutação foi direcionada, o gene *exoZ*.

4.12. Bactérias e plasmídeos.

A estirpe *Escherichia coli* DH10B foi utilizada na clonagem de produtos de PCR, utilizando vetor plasmidial pGEM T-Easy (Promega).

4.13. Meios de Cultura, condições de cultivo das bactérias.

A bactéria de *E. coli* estirpe DH10B foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani Broth (LB) conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

A bactéria selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 e seu mutante 4080Ω3 foram cultivados em meio de cultura TY “Tryptone-Yeast Medium” (BERINGER, 1974) a 29^o C, durante 24 h. Após este período foi retirada uma alíquota de 800 µl do cultivado, sendo essa adicionada em 200 µL de glicerol. Tal amostra foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente estocada a -80^o C, sendo esse o estoque definitivo.

Após o preparo os meios foram autoclavados por 20 min a 120^oC a 1 atm. As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas conforme descrito por SAMBROOK et al. (2001). As soluções estoque de canamicina (Kan) e ampicilina (Amp) foram preparadas em água destilada nas concentrações de 100 e 250 mg/mL respectivamente, e esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Todos os antibióticos foram estocados a -20^oC e adicionados aos meios de cultura imediatamente antes do uso. As concentrações usadas para cada estirpe foram: Concentração final para culturas de *E. coli* - Ampicilina (Amp) 100 µg/mL - Canamicina (Kan) 50 µg/mL. Concentração final para culturas de *R. tropici* - Canamicina (Kan) 30 µg/mL.

4.14. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores para isolamento do gene *exoZ*.

A construção dos oligonucleotídeos iniciadores *exoZ*-R e *exoZ*-F, utilizados para isolar o gene *exoZ*, foi baseada na sequência homologa das espécies (número de acesso entre parenteses): *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (RL0234); *R. etli* CFN 42 (RHE_CH00226); *R. etli* CIAT 652 (RHECIAT_CH0000269), que possuem o gene de interesse já identificado e sequenciado.

As sequências das ORFs relacionadas ao gene *exoZ* foram obtidas a partir dos bancos de dados do Projeto Genoma *R. leguminosarum* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum) e do Projeto Genoma *R. etli* (<http://kinich.cifn.unam.mx/~retligen/>).

A construção dos iniciadores para isolamento do gene de interesse foi feito através do programa “Gene Runner versão 3.05” (Hastings Software, Inc).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em TE 1X (constituído de 50 µL Tris-HCl 2M, 20 µL EDTA 0,5M e 9,93 mL H₂O milli-Q, pH final da solução 7,4) no qual foram obtidas soluções estoque com concentração de 100 pmoles/µL. Deste estoque foi retirado volume necessário para obtenção da solução de trabalho na concentração de 5 pmoles/µL.

4.15. Extração de DNA genômico.

A extração do DNA genômico das bactérias selvagem e mutante foi realizada segundo o método de MARMUR (1961) modificado.

As células foram cultivadas em meio líquido TY a 29⁰C, com agitação de 140 rpm por 32 h, a suspensão celular foi centrifugada a 4500 x g durante 20 min a 4⁰C, descartando o sobrenadante. O sedimento foi lavado duas vezes com 1000 µL de solução salina (NaCl 0,85%) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. O “pellet” foi ressuspensionado em 500 µL de solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida foram adicionados 40 µL

de lisozima (20 mg/mL), 13 µL de RNase (10 mg/mL) e deixadas no banho-maria a 37°C por 2 h. Posteriormente foi adicionado 44 µL de SDS 20%, para lise da parede celular e da membrana plasmática e a degradação de RNA. Após, 160 µL de Acetato de sódio 3M foi adicionado, seguido pela extração com 650 µL da mistura de 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. A precipitação do DNA ocorreu adicionando-se, posteriormente, dois volumes de etanol absoluto (4°C) à amostra. As amostras foram centrifugadas a 15.600 x g por 30 min a 4°C, e em seguida lavadas com 1000 µL de etanol 70%. O DNA obtido foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µL de água ultra-pura estéril.

4.16. Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA.

Os DNAs genômicos foram quantificados por meio de visualização após eletroforese em gel de agarose e, também, através do aparelho espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Uniscience). Para eletroforese foi utilizado gel de agarose 0,8 % acrescidos em brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese do DNA genômico foi realizada em uma cuba horizontal contendo tampão TEB 1x [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3]. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, FicollR 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,02%) e foram aplicadas no gel. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra que estava sendo analisada.

O marcador de tamanho molecular utilizado para servir como referência de migração eletroforética para cálculo dos tamanhos dos fragmentos foi o 1 kb DNA “Ladder” (Fermentas).

A revelação do gel foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho foto-documentador (Bio Rad – Universal Hood II), através do “software” Image Lab™.

4.17. Amplificação do gene *exoZ*

A amplificação dos genes de interesse foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER & WILSON (1991).

A padronização da reação de amplificação do gene *exoZ* foi realizada em termo gradiente (COBBERT), determinando-se a temperatura de pareamento ideal para o iniciador. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador de gradiente de temperatura, com os seguintes ciclos: 3 min de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos constituídos de: 40 segundos de desnaturação a 94°C, 1 min de pareamento com a temperatura variando a partir do ponto médio de 60,7°C, 1,5 min de elongação a 72°C. Após os ciclos, as reações foram submetidas a uma extensão final por 7 min a 72°C e 4°C até a retirada dos microtubos do termociclador.

Após cada reação de amplificação, os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, por eletroforese e o seu tamanho foi estimado por comparação com padrões lineares de DNA.

4.18. Purificação e clonagem dos insertos em vetor.

Os produtos da amplificação do gene *exoZ* foram purificados, segundo protocolo do kit de purificação Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para eliminar fragmentos de DNA não específicos e evitar clones falso-positivos.

Os produtos de PCR foram ligados ao vetor comercial pGEM T-Easy (Promega) para transformar *E. coli* DH10B conforme descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001). Este vetor possui 3.015 pares de bases (Figura 2). Entre as características específicas deste vetor, podemos citar: origem de replicação f1 ori para crescimento em *E. coli*; resistência a ampicilina; e sistema de seleção de colônias baseado na expressão do gene *lacZ*.

A ligação foi realizada mantendo uma relação de concentração de insertos de DNA da amostra em estudo com DNA vetor na proporção molar [1:3], relação esta exigida pelo kit.

A reação foi executada em um volume de 20 µL contendo: 1 µL da amostra amplificada (inserto a 12,5 ng), 2 µL de água Milli-Q estéril, 5 µL de tampão de

ligação 2 X, 1µL de pGEM T-Easy (50 ng /µL) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 unidades/µL). Essa reação foi mantida a 4°C durante 16 h.

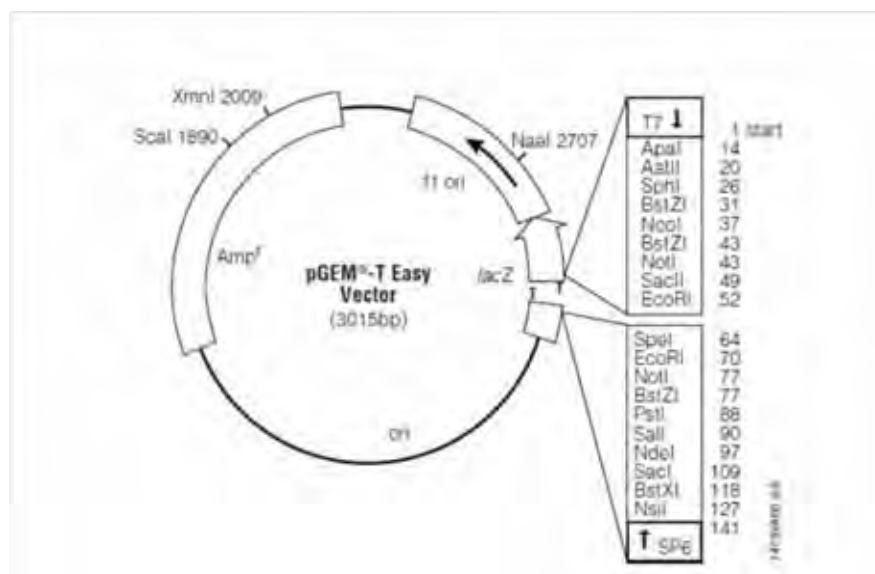


Figura 2: Ilustração do vetor pGEM-T EASY (Promega).

4.19. Transformação de células competentes de *E. coli*

As células competentes de *E. coli* estirpe DH10B, foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. E nos experimentos de transformação, foi utilizado o seguinte protocolo: Tubos plástico tipo "eppendorf" (1,5mL) contendo alíquotas de 200 µL células competentes de *E. coli*, estirpe DH10B, foram removidos do freezer – 80°C e mantidos no gelo para descongelamento lento. Posteriormente, os 10 µL da reação de ligação foram misturados aos 200 µL de células competentes, seguindo-se agitação suave. Os tubos foram mantidos em gelo por 30 min. Após esse tempo, a suspensão de células foi submetida a tratamento de choque térmico pela transferência do tubo para o banho regulado a 42°C por 90s, transferindo-o novamente para o gelo e mantendo-o por 2 min.

A estes foram adicionados 800 µL de meio SOC e incubados a 37°C, com agitação de 220 rpm, durante 1 h e 30 min em agitador rotativo. Decorrido esse

tempo, uma alíquota de 100 µL da cultura foi transferida para placas de Petri contendo meio LB, constituído de 100 µL de IPTG (0, 240 g dissolvidos em 5 mL de água, esterilizado por filtração) e 100 µL de X-GAL (0,05 g dissolvidos em 1 mL de Dimetil-formamida), contendo ampicilina a fim de se selecionar os transformantes, contendo o plasmídeo que ancora o gene de resistência ao antibiótico. As placas foram incubadas em estufa do tipo BOD (Biological Oxygen Demand) por 18 h a 37°C.

4.20. Seleção dos clones.

Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca. A inserção do fragmento de DNA se dá na região do gene *lacZ*, responsável pela síntese de β-galactosidase que quebra o substrato X-gal, originando coloração azul. Portanto, as células que receberam o inserto formam colônias brancas e as que não receberam, formam colônias azuis. Os clones transformados que formaram colônias bem isoladas foram transferidos com auxílio de um palito de madeira estéril para tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100mg/mL) e foram incubadas com agitação 220 rpm, a 37°C, por 22 h.

4.21. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*.

Foram coletados 10 clones transformados com o gene *exoZ* originado da linhagem selvagem e 4 clones transformados com *exoZ* originados da mutante. Após o período de incubação, os palitos foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada e a cultura foi utilizado para extração de DNA plasmidial. O isolamento do DNA plasmidial foi realizado segundo a metodologia descrita no protocolo do kit de extração “Wiz Plus SV Minipr DNA Purif Sys”, (Prodimol).

4.22. Sequenciamento e análise de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo o método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Após reação

de PCR de sequenciamento, as amostras foram submetidas ao sequenciamento por capilar utilizando o aparelho ABI 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas pelo "Sequencing Analysis 3.4" e a montagem da sequência, verificação da qualidade das bases dos eletroferogramas e arquivos gerados no formato FASTA foram realizados pelo pacote de programas "Phred/Phrap/Consed" (GORDON et al., 1998).

As sequências confirmadas nos sentidos 3' e 5' foram submetidas para buscar alinhamentos significativos, utilizando-se os algoritmos *Blastn* (para sequências de nucleotídeos) ou *Blastp* (para sequência deduzida de aminoácidos) através de sequências depositadas no banco de genes ("GeneBank database") do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequências deduzidas de aminoácidos obtidas neste estudo foram alinhadas no programa ClustalW, para analisar a homologia entre as mesmas.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de Crescimento

A curva de crescimento permite determinar qual é o tempo necessário para que o número de bactérias de uma determinada cultura duplique e pode ser calculado pelo tempo de geração de cada estirpe.

Para alcançar o escopo proposto na realização da curva é necessário garantir o ambiente, os nutrientes e as condições adequadas, assim, as bactérias irão absorvê-los e transformá-los para que cumpram suas funções básicas do metabolismo (SCHAECHTER et al., 1958).

O metabolismo de uma célula é a soma do seu catabolismo e anabolismo e depende não só do meio de cultura utilizado, embora não necessariamente em proporção de sua composição exata como da fase de crescimento na qual a célula se encontra. Grande parte dos processos metabólicos celulares requer ATP, o

qual, em geral, é produzido à custa da oxidação de uma fonte de carbono (DARNELL et al., 1990).

A fase Lag consiste em um período de adaptação, de baixa intensidade no crescimento celular e, muitas vezes, nem ocorre. Nesta análise a fase lag foi alcançada em 24 horas por todas as estirpes (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). A fase exponencial de crescimento, por exemplo, é uma fase de intenso metabolismo celular, porque durante multiplicação exponencial, as células consomem muita energia, a qual deve ser gerada pelo metabolismo celular aeróbico ligado a síntese de ATP pela cadeia respiratória (BARNETT, 1976). Na curva de crescimento obtida, a fase exponencial foi alcançada em 84 horas pela estirpe selvagem (Figura 3) e 96 horas pelas estirpes mutantes (Figura 4, 5, 6 e 7). A fase de declínio de crescimento da cultura e/ou morte celular é denominada Estacionária, esta foi alcançada em 168 horas por todas as estirpes (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7).

Durante a fase estacionária, em virtude da privação de nutrientes, que foram esgotados durante o crescimento exponencial, e o acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo, as células cessam a divisão e destinam-se a morte celular. Este destino é evitado no caso de células que sejam capazes de entrar em estado de esporos ou outras fases do ciclo vegetativo/reprodutivo. Durante o acompanhamento do cultivo celular, os dados de leitura da densidade óptica – 600 nm – foram plotados (Tabela 2).

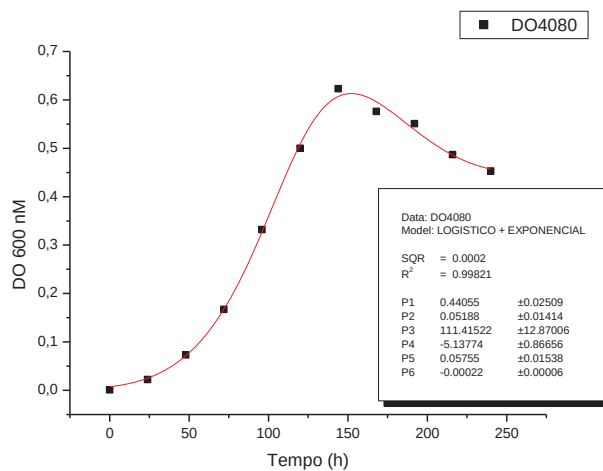


Figura 3: Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

Tabela 2: Densidade optica 600nm das estirpes selvagem e mutantes.

Tempo (horas)	DO. 4080	DO. M1	DO. M2	DO. M3	DO. M4
0	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
24	0,022	0,019	0,02	0,018	0,019
48	0,073	0,055	0,061	0,046	0,056
72	0,167	0,092	0,1	0,091	0,096
96	0,332	0,191	0,221	0,201	0,171
120	0,500	0,394	0,411	0,394	0,378
144	0,623	0,513	0,537	0,51	0,477
168	0,576	0,504	0,553	0,563	0,493
192	0,551	0,585	0,594	0,55	0,495
216	0,487	0,621	0,584	0,558	0,567
240	0,453	0,548	0,571	0,523	0,589

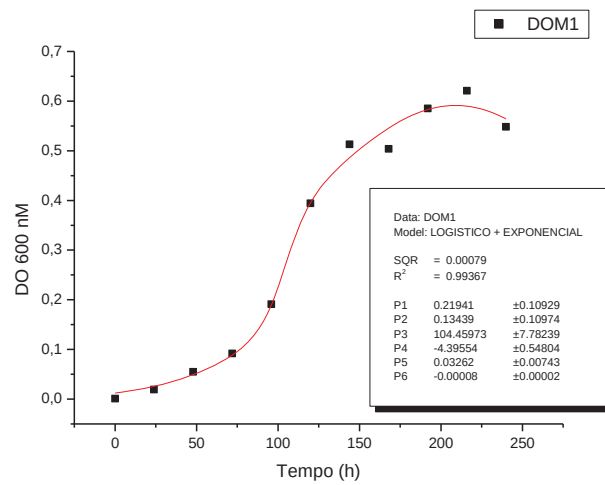


Figura 4: Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* Mutante 1, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

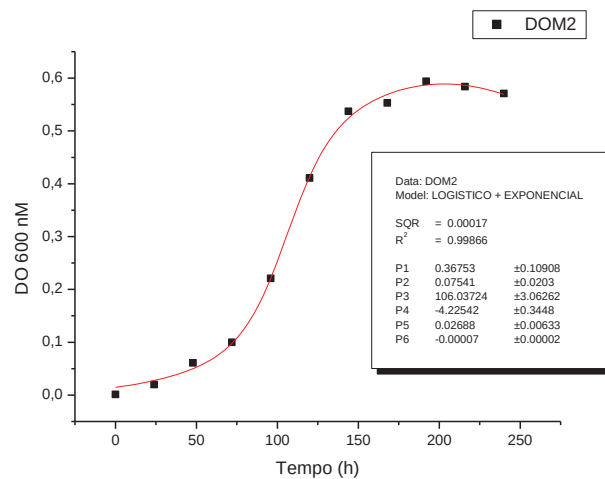


Figura 5: Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* Mutante 2, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

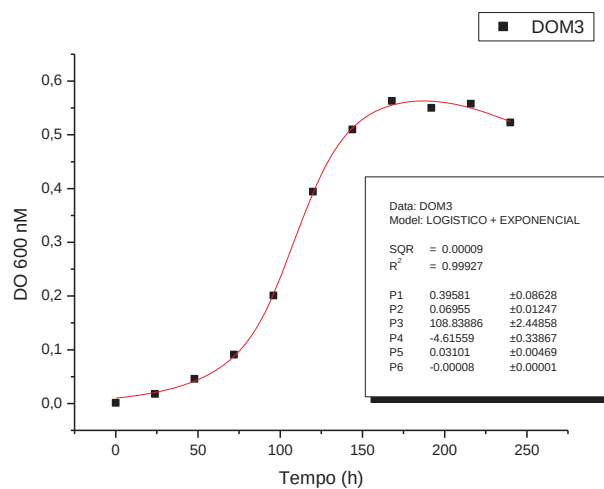


Figura 6: Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* Mutante 3, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

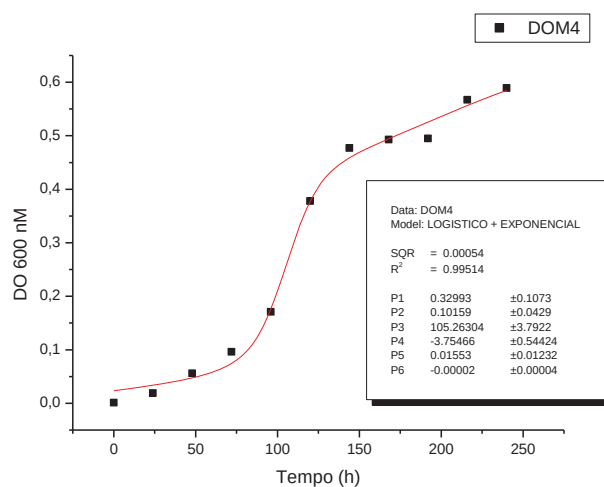


Figura 7: Curva de crescimento da estirpe *Rhizobium tropici* Mutante 4, mantidas em meio líquido RDM, com os respectivos parâmetros utilizados no modelo de equação, dada pela leitura da turbidez em relação ao tempo.

5.2. Qualidade do RNA total.

A verificação da qualidade do RNA extraído das fases lag, log, estacionária e bacterioides foi por meio de leitura de densidade ótica em espectrofotômetro NanoDrop, a pureza dada pela relação 260/280 do aparelho está descrita na Tabela 3. A concentração em ng/μL(Tabela 3) também foi aferida para iniciar a síntese do cDNA (Tabela 8).

Tabela 3: Pureza (valor da relação 260/280) e concentração do RNA.

<i>Estirpe</i>	Relação 260/280	Concentração de RNA ng/μL
SEMIA 4080 Lag	2,00	2301,4
Mutante 4080Ω1 Lag	2,00	352,3
Mutante 4080Ω2 Lag	1,70	1604,4
Mutante 4080Ω3 Lag	1,94	1186,1
Mutante 4080Ω4 Lag	2,00	2181,1
SEMIA 4080 Log	1,91	3317,4
Mutante 4080Ω1 Log	1,89	3471,9
Mutante 4080Ω3 Log	1,65	4134,9
Mutante 4080Ω4 Log	1,95	3135,4
SEMIA 4080 Estacionária	1,90	3616,2
Mutante 4080Ω1 Estacionária	1,95	3255,8
Mutante 4080Ω2 Estacionária	1,93	3035,3
Mutante 4080Ω3 Estacionária	1,99	2270,7
Mutante 4080Ω4 Estacionária	1,96	2894,3
SEMIA 4080 Bacterióide	1,86	792,9
Mutante 4080Ω1 Bacterióide	1,94	272,5
Mutante 4080Ω2 Bacterióide	1,91	304,5
Mutante 4080Ω3 Bacterióide	1,79	932,2
Mutante 4080Ω4 Bacterióide	1,81	586,8

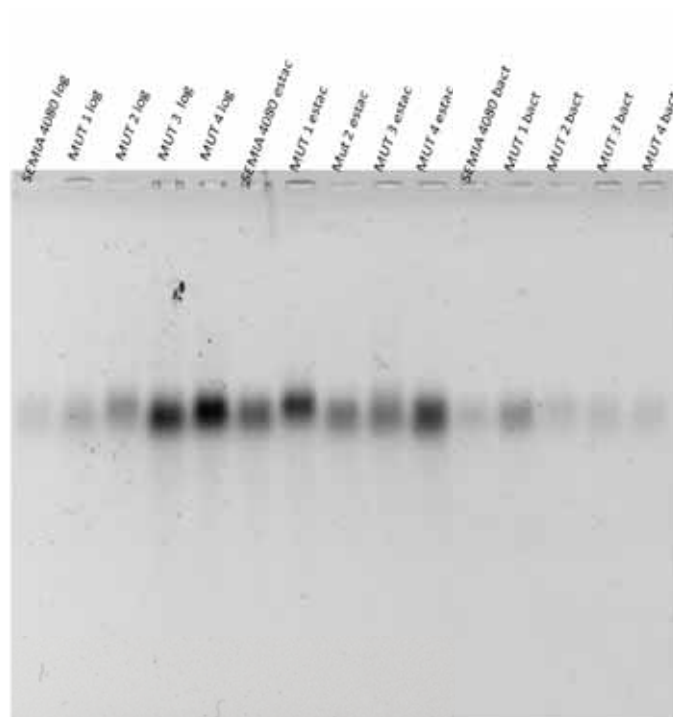


Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos cDNAs das estirpes SEMIA 4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4 nas fases log, estacionária e bacterióide.

5.3. PCR Real Time - Validação dos oligonucleotídeos iniciadores, eficiência de cDNA e curva de Dissociação

Para ensaio de validação dos oligonucleotídeos para os genes em estudo e dos cDNAs obtidos (Figura 8), realizou-se a PCR absoluta em tempo real. Dentre as diversas concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNAs testadas, os parâmetros com maior eficiência foram de 1000 nM (Figura 9) para os oligonucleotídeos iniciadores e de 3 µl de cDNA. Tal combinação apresentou melhores condições na amplificação / emissão de fluorescência da reação, garantindo eficácia e especificidade da mesma.

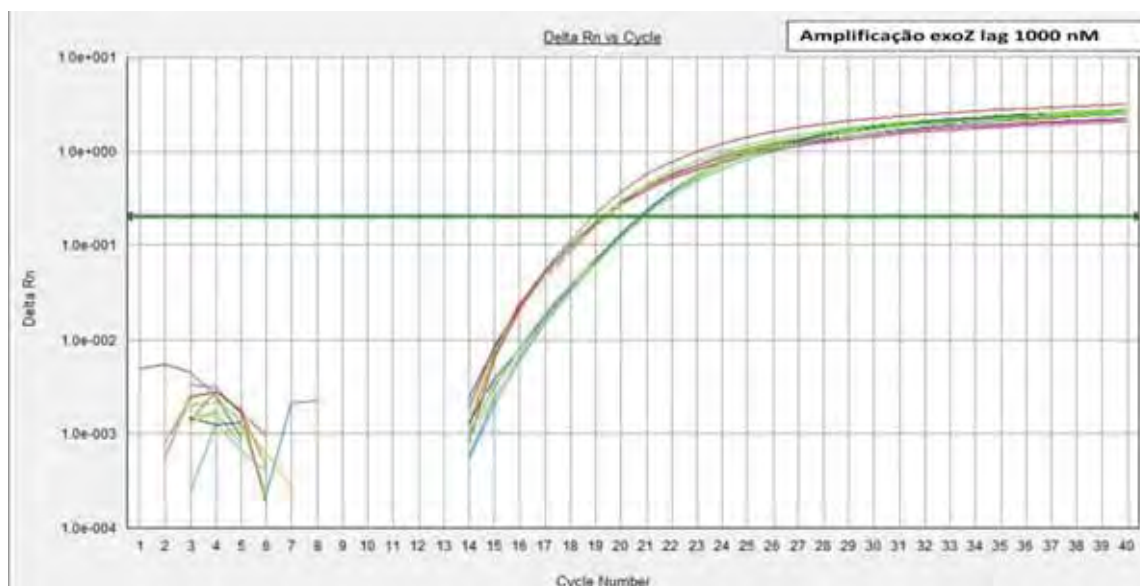


Figura 9: Perfil da amplificação do gene *exoZ* fase lag com 1000nM de oligonucleotídeo iniciador.

De acordo com os valores do C_t (*Cycle threshold*) pode-se detectar o limiar onde a fase exponencial da curva de amplificação se inicia; este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, exemplificado na Figura 9 e Figura 10 (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

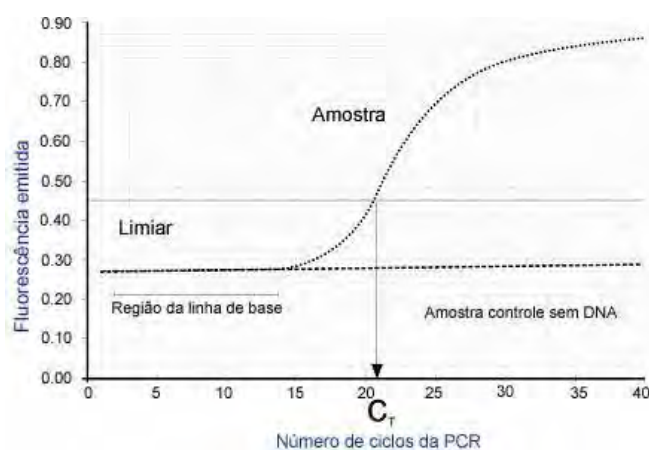


Figura 10: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. Linha de base: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; C_t início da fase exponencial, onde a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Nas reações de PCR utilizou-se o SYBR Green (fluoróforo), esta molécula absorve e emite luz em um comprimento de onda específico. Tal reagente proporciona o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos, por se tratar de um intercalante de fitas duplas que emite fluorescência, inclusive quando se liga a moléculas não-alvo, como dímeros de oligonucleotídeos iniciadores amplificados ou algum outro produto não específico. Portanto, é necessário avaliar a especificidade da reação. Para solução destes problemas, realiza-se a análise de dissociação.

A inclusão da curva de dissociação é essencial para verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. O aparecimento de um único pico na curva sugere a existência de um único produto (Figura 11 e 12), porém, se for observado o aparecimento de vários picos na curva, pode-se considerar a hipótese de formação de produtos inespecíficos na reação ou a eventual formação de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores.

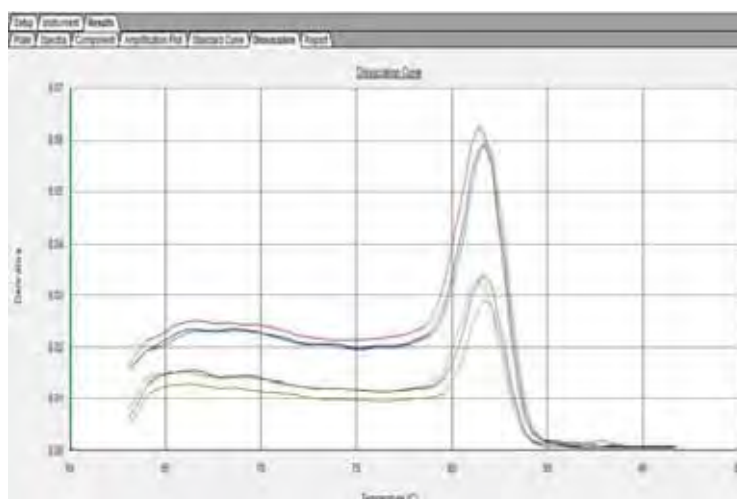


Figura 11: Curva de dissociação do oligonucleotídeo iniciador *exoZ*, demonstrando que não ocorreram dímeros ou contaminação na reação.

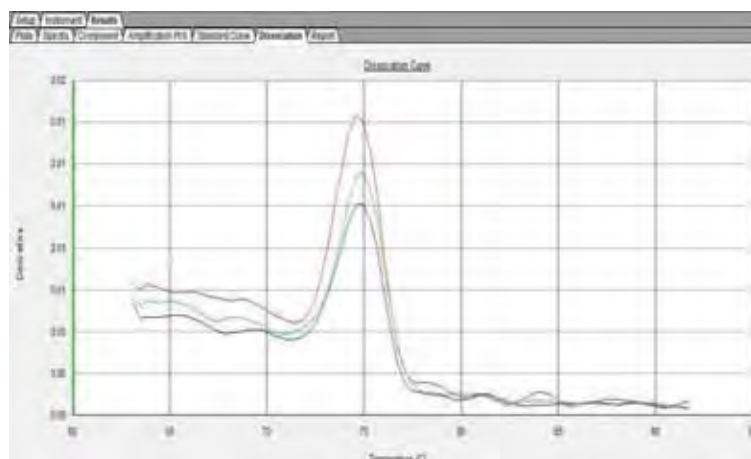


Figura 12: Curva de dissociação do oligonucleotídeo iniciador *phbC* demonstrando que não ocorreram dímeros ou contaminação na reação.

5.4. Reação de PCR Real Time

Dos genes avaliados na condição simbiótica, relacionados à fixação biológica do nitrogênio, para os genes *fixN* e *nifH* (Figura 13 e 14), observou-se que os mutantes 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4 apresentaram um perfil de expressão similar entre si, com nível de expressão com valor aproximado a 0,50 fold change (FC). O mutante 4080Ω1 apresentou a menor expressão desses genes, sendo que para *fixN*, o valor foi de 0,01(FC), em relação à estirpe selvagem.

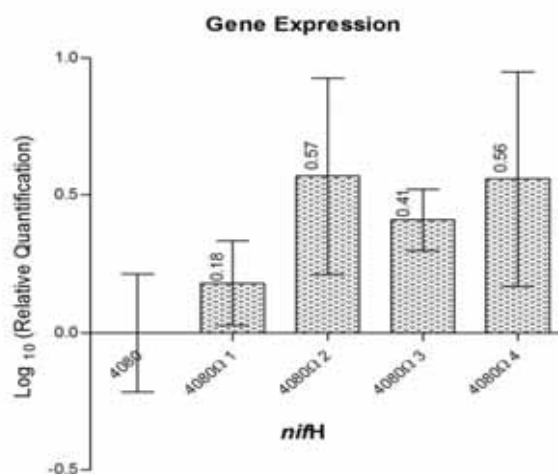


Figura 13: Níveis de expressão do gene *nifH* em condições de bacterióide (em simbiose) das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

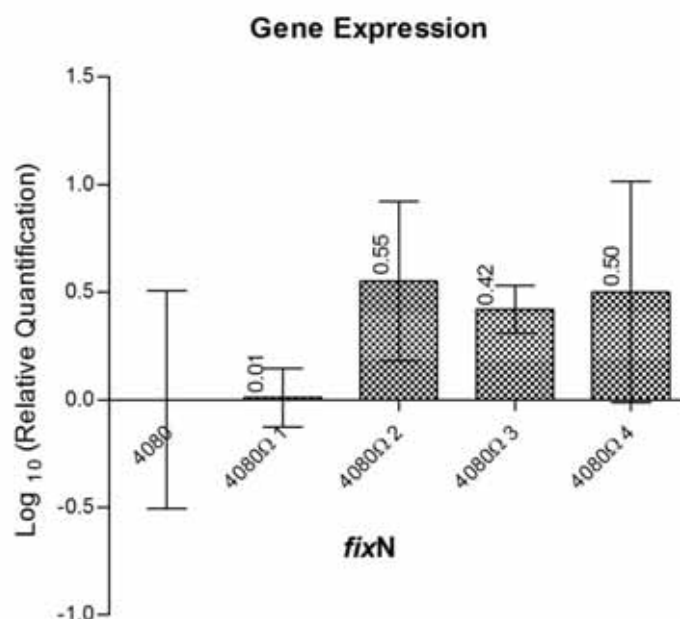


Figura 14: Níveis de expressão do gene *fixN* em condições de bacterióide (em simbiose) das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

Em relação ao gene *phbC* os níveis de expressão gênica observado nas diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana foi demonstrado na Figura 15. Na fase lag de crescimento não houve expressão deste gene no mutante 4080Ω1 e no mutante 4080Ω2, enquanto os mutantes 4080Ω3 e 4080Ω4 apresentaram níveis de expressão entre 0,39 e 0,97 (FC) respectivamente. Na fase exponencial, o gene *phbC* não foi expresso. Já na fase estacionária, a estirpe mutante 4080Ω2 apresentou maior taxa de expressão em relação às outras estirpes, as quais obtiveram níveis de expressão do gene *phbC* semelhantes.

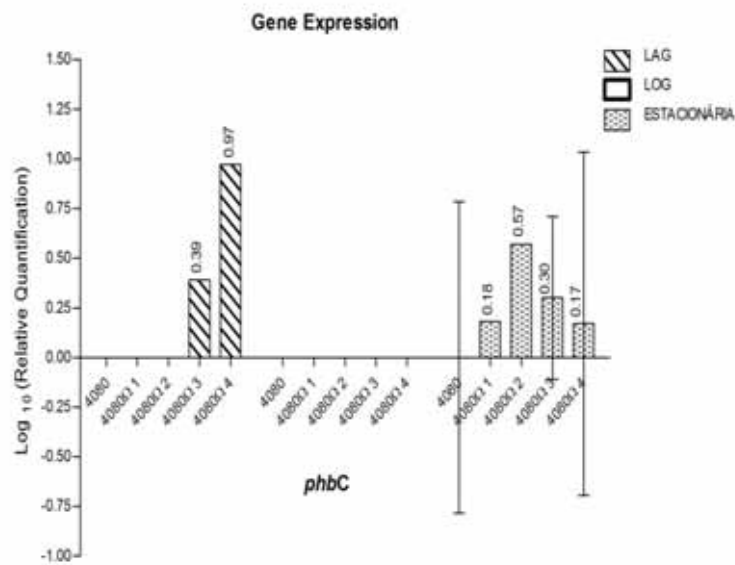


Figura 15: Níveis de expressão do gene *phbC* em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

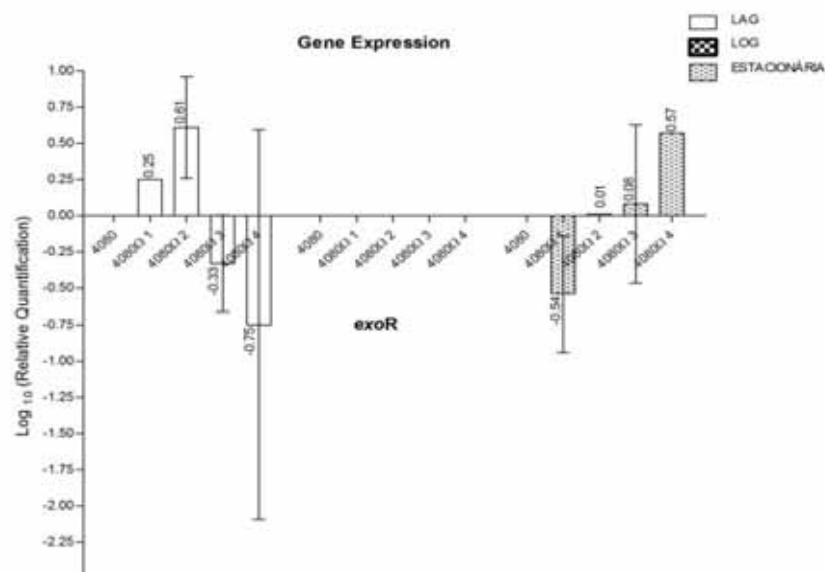


Figura 16: Níveis de expressão do gene *exoR* em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

Para o gene *exoR* (Figura 16), na fase lag a estirpe com melhor nível de expressão foi à mutante 4080Ω2, sendo que as estirpes mutantes 4080Ω3 e 4080Ω4 apresentaram expressão negativa do gene. Na fase exponencial não houve expressão gênica. O perfil da expressão na fase estacionária foi negativo para a estirpe mutante 4080Ω1, as estirpes mutante 4080Ω2 e 4080Ω3 apresentaram níveis de expressão entre 0,01 e 0,08 (FC) respectivamente e a estirpe mutante 4080Ω4 apresentou maior nível de repressão gênica na fase, referente a 0,57(FC).

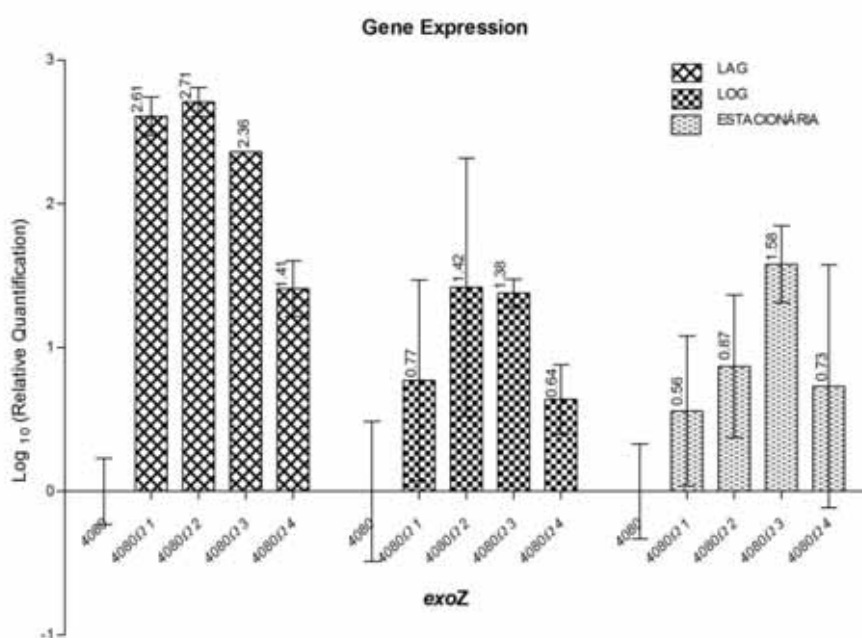


Figura 17: Níveis de expressão do gene *exoZ* em condições “in vitro” nas fases de crescimento Lag, Log e Estacionária das estirpes selvagem SEMIA4080 e mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

Foi observado na fase lag uma superexpressão do gene *exoZ* (Figura 17) nas estirpes mutantes 4080Ω1, 4080Ω2 e 4080Ω3, e a mutante 4080Ω4 apresentou nível de expressão com valor de 1,41(FC). Em condições de meio de cultivo “in vitro”, a fase lag muitas vezes corresponde ao estabelecimento e adaptação da cultura bacteriana. A maior expressão do gene *exoZ*, responsável

por parte da biossíntese de exopolissacarídeos, se deu provavelmente pelo estágio de adaptação das estirpes ao meio. Com o estabelecimento da cultura ao meio, na fase log, houve uma queda nos níveis de expressão do gene *exoZ*, onde os mutantes 4080Ω2 e 4080Ω3 foram os que apresentam maiores níveis de expressão dentre as estirpes estudadas nesta fase. A expressão do gene foi mais estável na fase estacionária, com valores próximos a 1,00(FC) dentre as estirpes. O mutante 4080Ω3 apresentou uma maior expressão do gene *exoZ*, com valor referente a 1,58 (FC).

5.5. Número mais provável

No NMP a estirpe selvagem obteve presença de nódulos em todas as diluições, sendo a diluição 10^{-8} que apresentou menor número de nódulos por raiz. As estirpes mutantes apresentaram resultados similares entre si, nas diluições 10^{-8} observou-se ausência de nódulos em pelo menos uma das repetições de cada tratamento, com exceção do Mutante 4080Ω3 que apresentou ausência de nódulos em todas as repetições da diluição 10^{-8} . Foram observadas diferenças na coloração dos nódulos, as estirpes mutantes possuíam nódulos com colorações esverdeadas, demonstrando talvez uma possível ineficiência na fixação do nitrogênio, como demonstrado na Figura 18A. Isto pode ser evidenciado pelo conhecimento de que a coloração avermelhada do nódulo é indicativa de eficiência na atividade nitrogenase, considerando a presença de leghemoglobina nos mesmos. A leghemoglobina contém cluster metálicos que são oxidados quando expostos ao ar atmosférico (CRAWFORD et al., 2000).

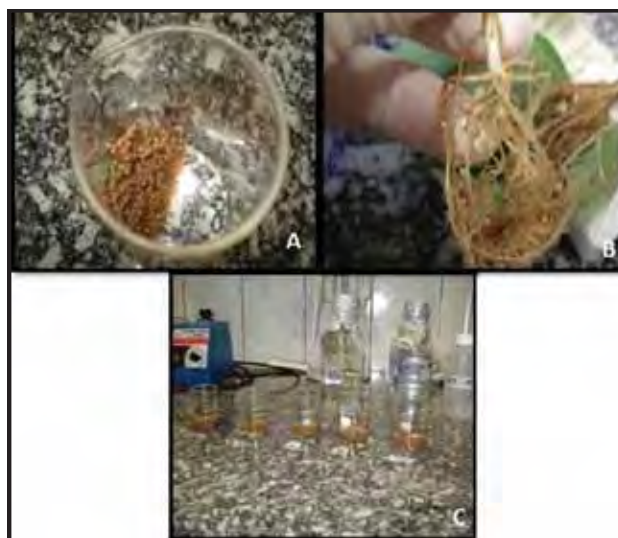


Figura 18: A - Nódulos de plantas inoculadas com estirpe mutante 4, B - Raiz planta inoculada com a estirpe SEMIA 4080, C - Nódulos desinfetados.

Seguindo os parâmetros da Tabela padrão de NMP (HUNGRIA & ARAUJO, 1994) os resultados obtidos foram reproduzidos e plotados na Tabela 4. Estes indicam o número de células viáveis por unidade de volume, baseado no número de tubos que foram inoculados, e demonstra crescimento conforme metodologia descrita anteriormente (HUNGRIA & ARAUJO, 1994). Na Tabela 4, a coluna designada como NMP refere-se ao número de células viáveis de rizóbio proveniente da solução matriz, a coluna designada como Prob (%) representa a chance de ocorrer à combinação obtida se o experimento fosse repetido um número infinito de vezes, com a mesma solução matriz.

De acordo com os parâmetros alcançados, o NMP da estirpe selvagem SEMIA 4080 foi superior ao descrito na Tabela de referência, todas as diluições apresentaram nódulos e o número de células viáveis na suspensão original é $>6,698 \cdot 10^{-8}$ células/g solo úmido. As estirpes mutantes alcançaram valores com referência na Tabela citada por HUNGRIA & ARAUJO (1994), sendo cada valor de células viáveis de cada estirpe descrito abaixo:

- Mutante 4080Q1: $38,499 \times 10^{-8}$ células/g solo úmido.
- Mutante 4080Q2: $138,569 \times 10^{-8}$ células/g solo úmido.

- Mutante 4080Ω3: $11,45 \times 10^{-8}$ células/g solo úmido.
- Mutante 4080Ω4: $70,197 \times 10^{-8}$ células/g solo úmido.

Tabela 4: Número mais provável.

Estirpe	NMP	Prob (%)	IC (min)	IC (max)
SEMIA 4080	> 6,698	0	3,528	13,339
Mutante 4080Ω1	38,499	36,95	16,169	170,485
Mutante 4080Ω2	138,569	42,197	52,601	507,08
Mutante 4080Ω3	11,45	25,514	4,428	38,923
Mutante 4080Ω4	70,197	37,36	37,36	271,301

Tabela 5: Número de tubetes com presença de nódulos.

Estirpe	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
SEMIA 4080	4 tubetes	4 tubetes	4 tubetes	4 tubetes
Mutante 4080Ω1	4 tubetes	4 tubetes	4 tubetes	1 tubete
Mutante 4080Ω2	4 tubetes	4 tubetes	4 tubetes	3 tubetes
Mutante 4080Ω3	4 tubetes	4 tubetes	3 tubetes	0
Mutante 4080Ω4	4 tubetes	4 tubetes	4 tubetes	2 tubetes

A ausência de nódulos nas plantas controle, não inoculadas, foi um indicativo de que as condições axênicas foram mantidas ao longo do experimento.

5.6. Análise de DNA genômico e do produto *exoZ*

O perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose do DNA genômico das estirpes SEMIA 4080 e 4080Q3 está apresentada na Figura 19. O DNA genômico não apresentou contaminação por RNA e mostrou-se íntegro, após o processo de extração. A pureza e a concentração do DNA foi plotado na Tabela 7.

A amplificação da região do *exoZ* foi realizada com uma solução de DNA genômico na concentração de 25 ng/μL. O produto da PCR obtido foi uma banda única de 750 pb e foi purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A purificação não apresentou restos de reação como dímeros e fragmentos inespecíficos (Figura 20). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região do gene *exoZ* está demonstrada na Tabela 6

Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para o gene *exoZ*.

Iniciadores	Sequências	Temperatura de Anelamento
exoZ-R	5'CGCCGCCGATTGACGACAGCA3'	60° C
exoZ-F	5'TGTCCTGAGGGGTTTCGTGAT3'	60° C

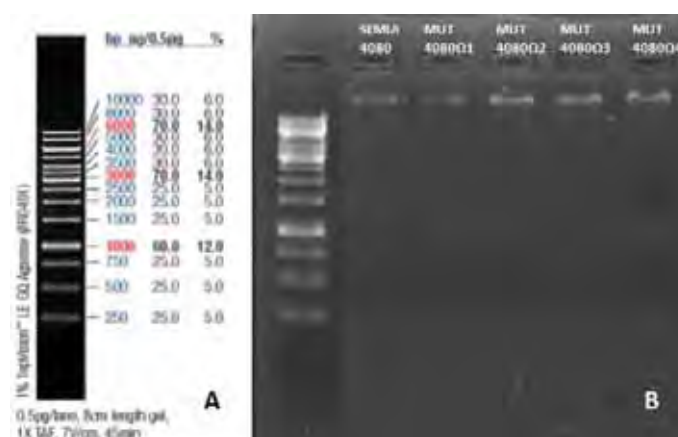


Figura 19: A: Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda.

B: Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% das amostras de DNA genômico das estirpes SEMIA 4080 e Mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

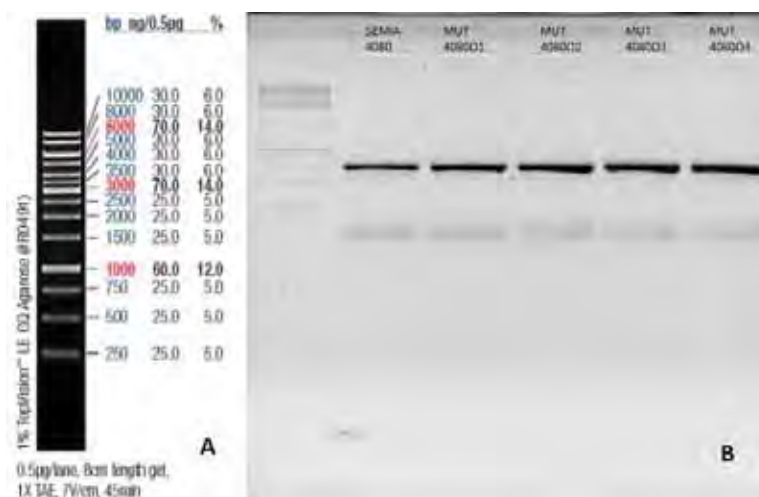


Figura 20: Figura: A: Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,0% das amostras de produto de PCR do gene *exoZ* das estirpes SEMIA 4080 e Mutantes 4080Ω1, 4080Ω2, 4080Ω3 e 4080Ω4.

Tabela 7: Quantificação DNA genômico em espectrofotômetro NanoDrop

Estirpe	260/280	ng/μL
SEMIA 4080	1,90	971,3
Mutante 4080Ω1	1,88	187,0
Mutante 4080Ω2	1,84	415,7
Mutante 4080Ω3	1,86	794,7
Mutante 4080Ω4	1,78	543,9

5.7. Clonagem do *exoZ* em vetor plasmidial

Após purificação do produto de PCR, foi realizado uma ligação em vetor pGEM-T Easy (Promega) e o produto ligado ao vetor foi inserido em célula competente de *E. coli* DH10B. A transformação resultou em 10 clones para a estirpe selvagem SEMIA 4080 e 04 clones da estirpe mutante 4080Ω3, que foram coletados e inoculados em tubos Falcon contendo 5mL de meio TY, sob agitação por 24h. Este inóculo foi utilizado para extração de DNA plasmidial. A qualidade do DNA plasmidial foi analisada em gel de agarose 0,8%. A extração plasmidial obteve êxito, sem contaminação de DNA genômico e/ou restos de reação.

Dos 10 clones iniciais da estirpe selvagem SEMIA 4080, os clones 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 ilustrados na Figura 21, e todos os 4 clones da estirpe mutante demonstrado na Figura 22, foram selecionados para seqüenciamento.

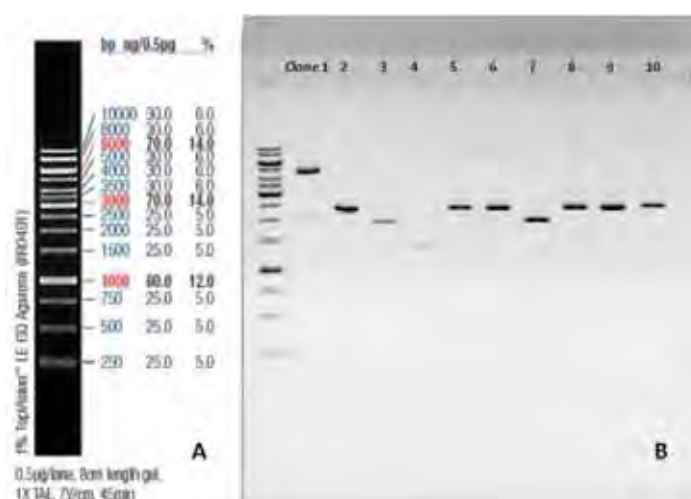


Figura 21: A - Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA plasmidial dos clones 1 a 10 da estirpe selvagem SEMIA 4080.

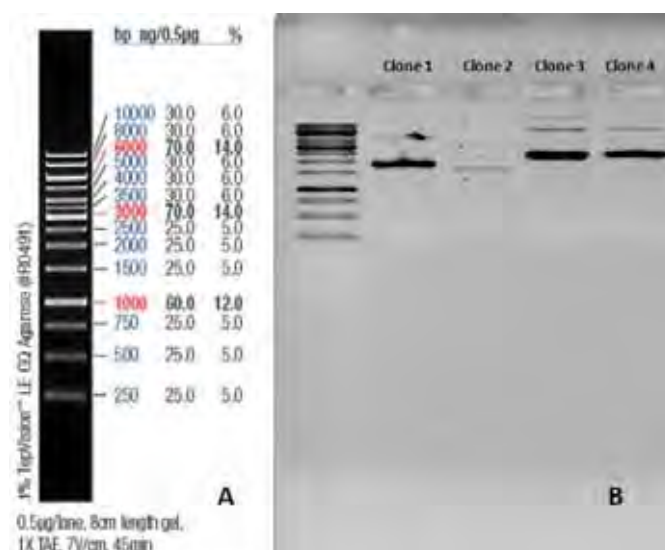


Figura 22: A - Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. B - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA plasmidial dos clones 1 a 4 da estirpe mutante 4080Ω3.

5.8. Sequenciamento e análise dos clones obtidos

A reação de PCR de seqüenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores do vetor T7 e SP6. Por meio do programa *Blastn*, que permitiu a comparação com sequências de nucleotídeos já depositadas no banco de dados, foi constatado que a sequência obtida tanto da estirpe selvagem quanto da estirpe mutante, possuem 75% de identidade com *Rhizobium leguminosarium* (Figura 23).

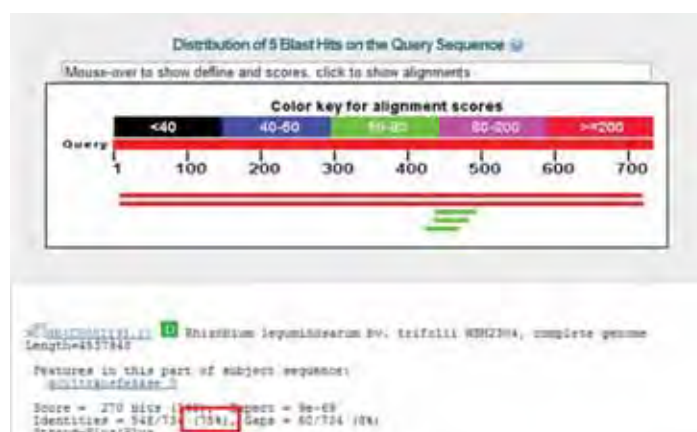


Figura 23: Identificação de similaridade de espécie das sequências das estirpes selvagem e mutante com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta Blastn.

Os dados obtidos de sequenciamento confirmaram o gene em estudo, uma vez que o DNA molde foi originado do gene *exoZ* (Figura 24). Os plasmídeos contendo o gene *exoZ* clonado foram denominados pGEMDNA4080 e pGEMDNA4080Ω3.



Figura 24: Comparação das sequências das estirpes selvagem e mutante com as sequências depositadas no banco do NCBI através da ferramenta Blastx.

A análise de alinhamento entre a sequência por meio da ferramenta *Blastn* apresentou uma similaridade de 99% entre as sequências (Figura 26B). O alinhamento das sequências também foi corroborado através do programa ClustalW, gerando uma sequência consenso demonstrada na Figura 25.

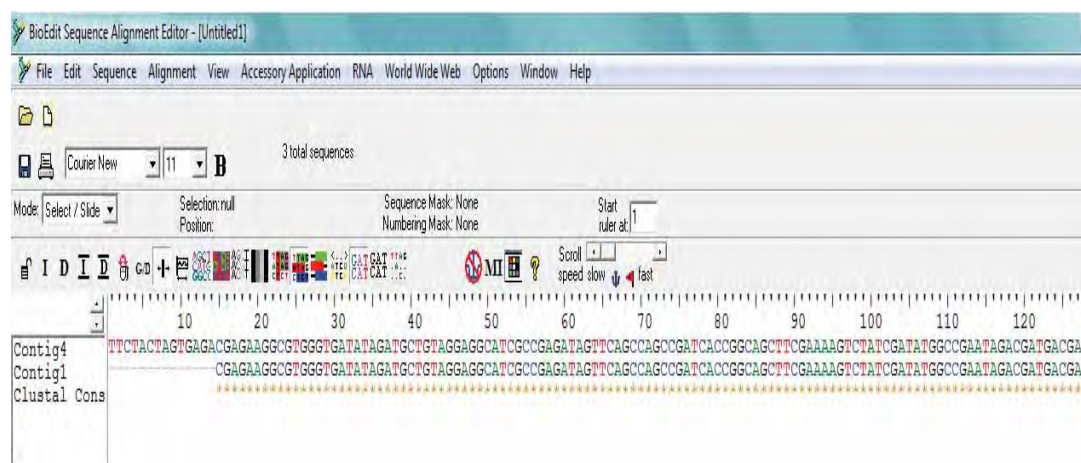


Figura 25: Alinhamento das sequências das estirpes selvagem e mutante por meio do programa ClustalW, juntamente com a sequência consenso. Contig4—sequência da estirpe selvagem e contig1 - sequência da estirpe mutante.

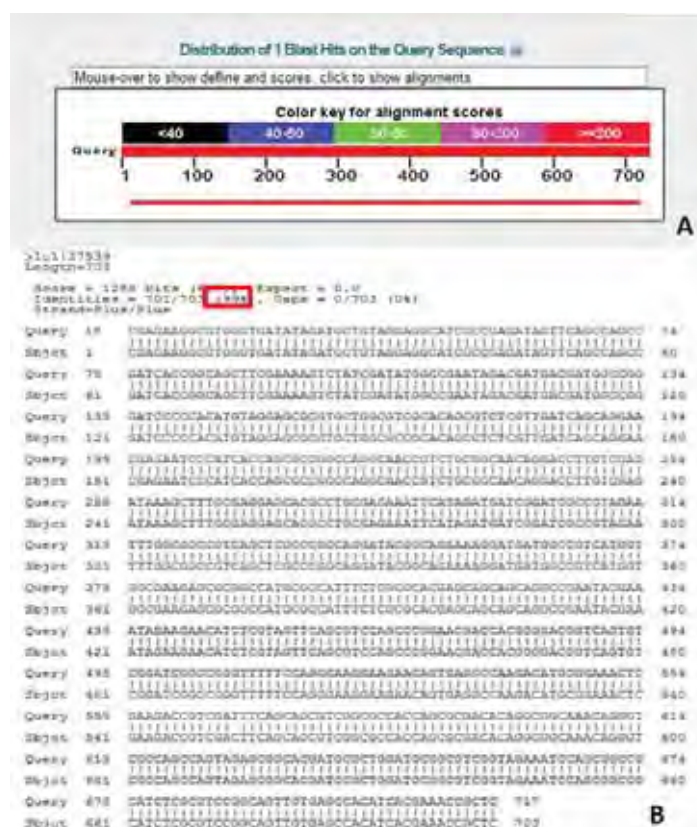


Figura 26: Alinhamento das sequências das estirpes selvagem e mutante através da ferramenta Blastn.

6. DISCUSSÃO

Os produtos dos genes *nif* são responsáveis pela estrutura, montagem e biossíntese do complexo enzimático da nitrogenase (MERRICK, 1992). O gene *nifH* codifica para as subunidades γ da proteína Fe-proteína e os genes *nifD* e *nifK* codificam as subunidades α e β da proteína MoFe-proteína respectivamente (SUR, 2010). Os resultados encontrados confirmam a expressão do gene para o complexo da nitrogenase, codificada pelo gene *nifH*, nos mutantes em estudo.

O gene *fixN* é responsável pela codificação da citocromo-c oxidase é especificamente requerida para a respiração do bacterióide. Contudo, o baixo nível de expressão de *fixN* pode indicar uma alteração nas condições microaerofílicas ou, ainda, na cascata de regulação do operon para este gene. Nestas condições, embora os genes para nitrogenase tenha se expressado, sua

atividade bioquímica pode estar comprometida, uma vez que os resultados encontrados no ensaio de NMP corroboram o fato de os mutantes apresentarem nodulação menos eficiente do que a encontrada na estirpe selvagem. CASTELLANE (2011) constatou diferenças no teor de nitrogênio das folhas de plantas inoculadas com os mutantes em estudo e confirmam-se menores taxas quando comparadas com a estirpe recomendada. Os dados não são suficientes para fenotipar os mutantes como Nod^+/Fix^- , mas fica claro que o processo de fixação biológica do nitrogênio foi à etapa mais prejudicada nesta simbiose.

De acordo com CASTELLANE (2011), mutações no sistema *exo* e *phbAB* apresentaram alterações na capacidade de fixar nitrogênio em plantas, quando comparada com a estirpe selvagem *Rhizobium tropici* SEMIA 4080. Os resultados dos dados de teores de nitrogênio nas folhas variaram bastante, tendo a estirpe selvagem apresentado maior eficiência relativa em comparação aos seus variantes.

Em relação ao gene *phbC* os níveis de expressão gênica observado nas diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana foi demonstrado na Figura 15.

PAGANELLI (2011) encontrou resultados parecidos em *Rhizobium huautlense* LMG 18254 que apresentou a maior expressão do gene nas mesmas condições analisadas, quando cultivada com sacarose em meio RDM como fonte de carbono. Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados, porque a expressão quantificada corresponde à enzima *phbC* sintase que sintetiza PHB e, portanto, a síntese do PHB ocorre em fase de crescimento seguinte, depois da expressão gênica do *phbC*. O acúmulo de PHB na fase estacionária, por exemplo, é consequência da expressão da enzima durante a fase log.

Os EPS participam da sinalização molecular no processo de simbiose com plantas de mecanismos de "quorum sensing" e de formação de biofilme (FUJISHIGE et al., 2008; RINAUDI, 2010). A produção de EPS está relacionada à resistência microbiana em condições de estresses ambientais. Além disso,

também estão relacionados a papéis ecológicos dos microrganismos, como a infecção de hospedeiros e expressão de virulência.

A maior expressão do gene *exoZ*, responsável por parte da biossíntese de exopolissacarídeos, se deu provavelmente pelo estágio de adaptação das estirpes ao meio, fase lag. Com o estabelecimento da cultura ao meio, na fase log, houve uma queda nos níveis de expressão do gene *exoZ* e nesta fase as rotas de metabolismo de carbono são direcionadas às vias de biossíntese de esqueletos de carbono que irão compor as estruturas celulares em formação.

Exopolissacarídeos são metabólitos secundários também produzidos principalmente na fase estacionária de crescimento microbiano (SUTHERLAND, 1998), corroborando o perfil da expressão encontrado no estudo.

Segundo SKORUPSKA (2006), mutação no gene *exoZ* em *S. meliloti* induz a formação de nódulos ineficientes, sem bacteriídeos na região intracelular do nódulo. O encurvamento do pêlo radicular pode ser atrasado e o processo de infecção afetado. O gene *exoZ* codifica uma transferase e está envolvido na adição de resíduos acetil, portanto, um mutante *exo* que produz succinoglicano sem a modificação acetil, forma nódulos na planta, porém exibe uma eficiência reduzida nos processos iniciais da simbiose, tais como o encurvamento do pêlo radicular e o processo de formação do cordão de infecção.

Estudos em mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e bv. *trifolii* mostram que indivíduos que apresentaram maior produção de EPS, afetam a capacidade de induzir os processos de infecção e também afetam o desenvolvimento e a liberação de bacteriídeos no processo de fixação (JANCZAREK et al., 2001; NEERAJ et. al., 2009). Esses dados confirmam o encontrado, os mutantes em estudo apresentam maior produção de EPS e uma menor eficiência na nodulação de feijoeiro.

De acordo com SKORUPSKA (2006), os genes *exoR* e *exoS* regulam negativamente a síntese de succinoglicano. Mutantes nos genes *exoR*⁻ e *exoS*⁻ produziram mais succinoglicano do que estirpes selvagens, estes genes regulam

a expressão de outros genes. Em *Sinorhizobium meliloti*, o gene *exoR* codifica o componente protéico de ExoR, fato inicialmente descoberto com o isolamento do mutante *exoR95::Tn5* (LU & CHENG, 2010).

A etapa de encurvamento do pelo radicular e início do processo de infecção na FBN, segundo LU & CHENG (2010) em *S. meliloti* requer a presença do EPS succinoglicano, que é regulado pelo sistema ExoR-ExoS/ChvI, este sistema regula a expressão de centenas de genes, inclusive o gene *exoR*.

O gene *exoR* tem papel importante na regulação negativa na síntese de succinoglicano, os resultados encontrados de expressão negativa podem ser explicados, uma vez que os mutantes em estudo produzem mais EPS, e isto pode ter afetado de forma negativa a expressão do gene *exoR*.

Os dados do sequenciamento comparativo foram indicativos que possivelmente a mutação não tenha ocorrido na região correspondente ao gene *exoZ*, uma vez que não foram encontradas diferenças entre as sequências do mutante em comparação com o selvagem. Apesar de a mutação ter sido direcionada para este gene, o transposon pode ter se comportado de forma inesperada no genoma, até mesmo se inserindo em outro gene.

Os transposons Tn são móveis tanto nos cromossomos bacterianos quanto nos plasmídeos, e podem causar mutações caso se insiram em genes ou em regiões reguladoras de genes (KLECKNER, 1990). De acordo com REZNIKOFF (2008) os transposons têm grande variedade de efeito sobre a expressão gênica, eles podem desencadear duplicações, deleções e translocações. Portanto, é provável que os resultados encontrados na expressão do gene *exoZ*, como o ganho de função, deu-se pela mutação na região promotora ou na geração de novas cópias gênicas. A caracterização genética desta mutação será importante na determinação dos aspectos funcionais observados nos mutantes adquiridos.

7. CONCLUSÕES

- A técnica de qPCR se mostrou bastante eficiente na análise de expressão dos genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio, em diferentes condições.
- A mutação dirigida ao operon *exo* aparentemente não alterou drasticamente a expressão dos genes *nifH*, *fixN* e *phbC*, os quais apresentaram níveis positivos de expressão na maioria das condições avaliadas, contribuindo normalmente com o processo de fixação biológica do nitrogênio.
- A expressão do gene *exoR* foi afetada nos mutantes. Este gene tem participação na regulação de outros genes *exo*, no entanto, nos mutantes a produção do exopolissacarídeo não foi afetada pela repressão desse gene.
- Considerando a superexpressão dos genes cuja mutação foi direcionada, devemos supor que o ganho de função deu-se pela mutação na região promotora ou na geração de novas cópias gênicas, repetidas *in tandem*.
- Os mutantes são mais eficientes na produção de EPS, sendo assim, indicados para utilização biotecnológica.
- Análises de sequenciamento do gene *exoZ* demonstraram que este não foi alterado.

8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AHMED, A. Alternative Mechanisms for Tn5 Transposition. **PLoS Genet** 5(8). 2009.

ALBERHEIN, P.; NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plants cell-wall polysaccharide by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 5, p. 340-345, 1967.

AMARGER, N.; MACHERET, V. & LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **Intr. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, p. 996-1006, 1997.

APPLIED BIOSYSTEM. Disponível em:

<[HTTP://www.roche_applied_science.com](http://www.roche_applied_science.com)>. Acesso em 26 de julho de 2010.

BARNETT, J.A. The Utilization of Sugars by Yeasts. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 32, p. 125-233, 1976.

BECHER, A.; NIEHAUS, K.; PUHLER, A. Low-molecular-weight succioglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutant *ExoP* protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 191-203, 1995.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Eds.). *The Rhizobiaceae*. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, p. 97-118, 1998.

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

BERKUM, P.V.; BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 3, p. 491-517, 1980.

BIEDERMANN, K.; DANDACHI, N.; TRATTNER, M.; VOGL, G.; DOPPELMAYR, H.; MORE, E.; STAUDACH, A.; DIETZE, O.; HAUSER-KRONBERGEN, C. Comparison of Real-Time PCR Signal-Amplified in Situ Hybridization and Conventional PCR for Detection and Quantification of Human papillomavirus. in Archival Cervical Cancer Tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3758- 3765, 2004.

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

BROEK, A. V.; LAMBRECHT, M.; VANDERLEYDEN, J. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v. 144, p. 2599-2606, 1998.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, 2000.

CASTELLANE, T.C.L. & LEMOS E.G.M. **Construção de mutantes nos genes *exo* da síntese de exopolissacarídeos e do gene *phbC* da síntese de PHB em *Rhizobium tropici* SEMIA 4080.** Tese de Doutorado, UNESP/FCAV, Jaboticabal. 2011.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CASTELLANE, T. C. L. **Composição dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes estirpes padrões de rizóbio.** 95f Monografia (Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzido por estirpes de rizóbio cultivado em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p. 1503-1506, 2007

CHEN, H.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G. Rolfe. Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host-range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharide synthesis. **J. Plant Physiol**, v. 120, p. 331–349, 1985.

CHEN, H.; GRAY, J. X.; NAYUDU, M.; DJORDJEVIC, M. A.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G. Five genetic-loci involved in the synthesis of acidic exopolysaccharides are closely linked in the genome of *Rhizobium* sp.strain NGR234. **Mol. Gen. Genet**, v. 212, p. 310–316, 1988.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988.

CONAB, 2010. Disponível em:

<<http://www.conab.gov.br/conab/Main.php?MagID=3&MagNo=74>> Acesso em: 19 de agosto de 2010.

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends Plant Science**, v.3, p.389-395, 1998.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T. & LONG, S.R. Nitrogen and Sulfur. *In*: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**, p.786, 2000.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular Cell Biology**. 2Ed., Scientific American Books, Inc.; New York, p. 3,4. 1990.

DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C. Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro comum. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 131p. 2005.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

EADY, R.R. (1986) Enzymology in free-living diazotrophs. *In*: BROUGHTON, W.J.;PUHLER, S. (eds). **Nitrogen Fixation**. Clarendon Press, v. 4, p. 1-49, 1996.

EARDLY, B.D.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S. & SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 507-512, 1995.

FAPESP. **Revista Pesquisa FAPESP – DUPLA HÉLICE 50 ANOS**, 2003.

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

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; TSAI, S. M. Caracterização da diversidade genética em feijão por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 381-385, fev. 2001.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. **Eur. J. Biochem.**, v.270, p.1365-1380, 2003.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison, The University of Wisconsin Press, p. 343, 1932.

FUJISHIGE, N.A.; LUM M.R.; DE HOFF P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.; HIRSCH A.M.. Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation.

Molecular Microbiology, v. 67: 504–515. 2008

FUKAGAWA, K.; YAMAGUCHI, H.; UTANI, O. Structural Studies on Fucogalactan produced by *Rhodotorula glutinis* K – 24. Characterization of acetyl ester and application of sequential periodate oxidation. **Agr. Biol. Chem.**, v. 39, n. 9, p. 1703 – 1710, 1975.

GALLO, R. & MIYAZAKA, S. Composição química do feijoeiro e absorção de elementos nutritivos, do florescimento a maturação. **Bragantia**, v. 20, n. 40, 1961.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York, **Springer-Verlag**, v.1. p.119-166. 2001.

GIBSON, A. H. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In: ELKAN, G.H. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p. 321-369.

GIDLEY, M. J.; MCARTHUR, A. J.; UNDERWOOD, D. R. ¹³C NMR characterization of molecular structures in powders hydrates and gels of galactomannans and glucomannans. **Food Hydrocolloids**, v. 5, p. 129-140, 1991.

GONZALÉZ, J.E.; REUHS, B.; WALKER, G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proceeding of National Academy of Science of United States of America**, v. 93, p. 8636-8641, 1996.

GORDON D, ABAJIAN C, GREEN "Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing". **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.195–202, 1998.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 475-484, 1992.

GRAY, J. X.; DJORDJEVIC, M. A.; ROLFE, B. G. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. **J. Bacteriol**, v. 172, p.193–203, 1990.

- GREEN, B.; BOUCHIER, C.; FAIRHEAD, C.; CRAIG, N.L.; CORMACK, B.P. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 Transposons. **Mobile DNA**, v. 3, p. 3, 2012.
- HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. & PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2775-2779, 1995.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio-Technology**, v.10 p.413–417, 1992.
- HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Curr Opin Plant Biol**, v. 2, p. 320–326, 1999.
- HUNGRIA, M. et al. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.) *Biologia dos solos dos cerrados*. Brasília: **Embrapa Cerrado**, c. 5, p. 187-258, 1997.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola. **EMBRAPA-SPI**, Brasília, Documento 46, 542p. 1994.
- JANCZAREK, M.; KUTKOWSKA, J.; MAZUR, A.; WIELBO, J.; BORUCKI, W.; KOPCINSKA, J.; LOTOCKA, B.; URBANIK-SYPNIEWSKA, T.; SKORUPSKA, A. Mutation in the pssB-pssA intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability. **J. Plant Physiol**, v.158, p. 1565-1574, 2001.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae Conn. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. p.235-244. 1938.
- KLECKNER, N. Regulation of transposition in bacteria. *Annu. Rev. Cell Bioi*, v.6, p. 297-327, 1990.

- KOCHER TD & WILSON AC. DNA amplification by the polymerase chain reaction. pp. 187-209 in *Essential Molecular Biology*, Volume 2. **T.A. Brown** (ed.) Oxford University Press. 1991.
- KUYKENDALL, L.D.; YOUNG, J.M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus *Rhizobium*. In: Garrity, G. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**, 2^a ed., v. 2. M. Springer-Verlag, New York, 2003.
- LEWIN, B. Transposons. In Lewin B., **Genes IX**. 9^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2009
- LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Science**, v.22, p.37-78, 2003.
- LONG, S.R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **Plant Cell**, v.8, p.1885- 1889, 1996.
- LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, U.; TIMMIS, K. M. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v.172, p. 6568-6572, 1990.
- LU, H.Y. & CHENG, H.P. Autoregulation of *Sinorhizobium meliloti* *exoR* gene expression. **Microbiology**, v. 156, p. 2092–2101. 2010.
- MAPA, 2011. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 13 de outubro de 2011.
- MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **J. Mol. Biol**, v. 3, p. 208-218, 1961.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H. & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. **Inter. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41, p. 417-426, 1991.
- MERRICK, M.J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRRIS, R. H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 835-876, 1992.

- MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E. & VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 26, p. 193-205, 1998.
- MOREIRA, LM; BECKER, JD; PÜHLER, A; BECKER, A. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. **Microbiology**, v.146, p.2237-2248, 2000.
- MORGANTE, C., CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1436–1444, 2005.
- MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1222–1225, 2007.
- NEERAJ, L.; GAURAV, S. S.; CHATTERJEE, S.; MAHESH, C. Exopolysaccharides and lipopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* tn5 mutants infecting *Vigna radiata* L. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, n. 5, 2009.
- NELSON, J. H.; HAWKINS, G. A.; EDLUND, K. et al. A Novel and Rapid PCRBased Method for Genotyping Human Papillomaviruses in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 38, n. 2, p. 688-695, 2000.
- NOVAIS, C. M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, DF, n. 33, p. 10-13, 2004
- PAGANELLI, F.L.; LEMOS, E.G.M.; ALVES, L.M.C. Polyhydroxybutyrate in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*: quantification and *phbC* gene expression. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 773–778, 2011.
- PALAZZI, M. A.; ERWENNE, C. M.; VILLA, L. L. Detection of human papillomavirus in epithelial of the conjunctiva. **São Paulo Medical Journal/ Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, SP, v. 118, n. 5, p. 125-130, 2000.
- POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.296, p.375-85, 1982.

- REINHOLD, B. B.; CHAN, S. Y. ; REUBER, T. L. ; MARRA, A.; WALKER G. C.; REINHOLD V. N. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p. 1997–2002, 1994.
- REZNIKOFF, W. S. Transposon Tn5. **Rev. Genet**, v. 42, p. 269–86, 2008.
- RHIZOBASE (The Genome Database for Rhizobia). Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>.
- RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, A.; GIORDANO, W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.15-21, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed., New York: **Cold Spring Harbor**, 2001.
- SANGER F, NIKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.74:5, p.163-9, 1977.
- SAWADA, H.; KWYKENDALL, L.D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.
- SCAMPARINI, A.; VENDRUSCULO, C.; MALDONADE, I.; DRUZIAN, J.; MARIUZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganism for use in foods. *Hydrocolloids*. Part 1. **Physical Chemistry Industrial Application of Gels Polysaccharides, and Proteins**. Edited by Katsuyoshi Nishinari. Osaka City University, Osaka, Japan, p. 169-178, 2000.
- SCHAECHTER, M.; MAALØE, O.; KJELDGAARD, N.O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. **J Gen Microbiol.**, v. 19, p. 592-606, 1958.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Inter. J. Syst. Bacteriol.**, v. 43, p. 374-377, 1993.

- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 43, p.374-377, 1993.
- SGARBIERI, V.C. Composição e valor nutritivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BULISANI, E.A.(Coord.). **Feijão: Fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargill, p.257-316, 1987.
- SHARP, P.A.; BERK, A.J.; BERGET, S.M. Transcription maps of adenovirus. **Methods Enzymol.** V. 65, p. 750-768, 1980.
- SIEFERT, J.L. Defining the mobilome. p.13-27. In Gogarten, M.B.; J.P. Gogarten, & L.Olendzenski, Horizontal Gene Transfer: **Genomes in Flux**. New York, NY: HumanaPress, 2009.
- SKORUPSKA, A; JANCZAREK, M; MARCZAK, M; MAZUR, A; KROL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v.5, p.1-19, 2006.
- SKORUPSKA, A; JANCZAREK, M; MARCZAK, M; MAZUR, A; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v.5, p.1-19, 2006.
- SNYDER, L. & W. Champness. Transposition and site-specific recombination. In Snyder, L. e W. **Champness, Molecular Genetics of Bacteria**. 2ª edição, p. 330-340. Washington, DC.: ASM Press, 2003
- SOUSA, S.M; DAMASCENO, C.M.B; NODA, R.W. O papel das mutações na compreensão da genética do milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. P. 33, 2010.
- STAEHELIN, C.; FORSBERG, L.S.; D'HAENZE, W.; GAO, M.; CARLSON, R.W.; XIE, Z.; PELLOCK, B.J.; JONES, K.M.; WALKER, G.C.; STREIT, W.R.; BROUGHTON, W.J. Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.6168-6178, 2006.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN, W. J.; RAASCH, C.;LIESEGANG, H.; BROUGHTON, W. J. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **J. Bacteriol**, v. 186, p.535–542, 2004.

SUR, S.; BOTHRA, A.K.; SEN, A. Symbiotic Nitrogen Fixation. A Bioinformatics Perspective. **Biotechnology**, v. 9, p. 257-273. 2010.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal, Barking**, n.11, p.663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 719p. 2004.

THOMAS, P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.77, p. 5201-5205, 1980.

TRAINER, M.A.; CHARLES, T.C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 377-386, 2006.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ.**, v. 29, p. 151–159, 2005.

WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mezorhizobium tianshanense*: plant host interaction. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 525-530, 2008.

YAMADA, T. et al. Cultura do Feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. **Piracicaba: Potafós**, 1988.

ZHAN, H. J.; GRAY, J. X.; LEVERY, S. B.; ROLFE, B. G.; LEIGH, J. A. Functional and evolutionary relatedness of genes for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium* sp. strain NGR234. **J. Bacteriol.**, v.172, p.5245–5253, 1990.