

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

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA
587 “IN VITRO” E EM SIMBIOSE COM SOJA (*Glycine max* L.
Merrill) ATRAVÉS DE MICROARRANJO DE DNA**

Jackson Antônio Marcondes de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL
AGOSTO – 2006**

S729p Souza, Jackson Antônio Marcondes de
Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA / Jackson Antônio Marcondes de Souza. – – Jaboticabal, 2006
xvii, 139 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Maria José Valarini, Norma Gouvêa Rumjanek, Lúcia Maria Carareto Alves, Fátima Maria de Souza Moreira
Bibliografia

1. Bacterióide. 2. *Bradyrhizobium elkanii*. 3. Microarranjo de DNA.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5:633.34

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

JACKSON ANTÔNIO MARCONDES DE SOUZA – nascido em Bebedouro (SP), em 16 de agosto de 1974, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) em Campos dos Goytacazes (RJ), no ano de 1997. Ingressou no Curso de Mestrado, em 1997, recebendo o título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, Área de Concentração em Engenharia Genética, pela mesma universidade em maio de 2000. Em agosto de 2003, iniciou o Doutorado, no curso de Pós-graduação em Microbiologia, Área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal (SP).

“E apliquei o meu coração a esquadrihar, e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; esta enfadonha ocupação deu Deus aos homens, para nelas os exercitar. Porque na muita sabedoria há muito enfado; e o que aumentar em ciência, aumenta em trabalho.”

(Eclesiastes 01, versos 13 e 18)

***À minha esposa Marilânia, amiga e companheira em
todos os momentos, e a nossa amada filha Júlia,***

***Ao meus pais Jayme e a Alzira, pessoas zelosas que
lançaram as bases da minha formação,***

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos pela agradável acolhida em seu laboratório, pela orientação e oportunidade para desenvolver este trabalho, pela confiança e amizade;

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves pelo apoio, conselhos e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Lemos, e demais membros do Laboratório de Genética de Bactérias, pela amizade e diversos auxílios prestados;

À Dra. Regiane de Fátima Travensolo e Dra. Luciane P. Ciapina que me introduziram na tecnologia dos microarranjos de DNA;

Ao Dr. João Carlos Campanharo pelos constantes auxílios prestados no laboratório;

Aos bioinformatas Maurício Egídeo Cantão, Luciano T. Kishi e Rodrigo Matheus Pereira pelo auxílio com os programas e análises envolvendo bioinformática;

A todos os alunos de iniciação científica e pós-graduandos pelo empenho no seqüenciamento dos clones da biblioteca de DNA genômico;

Aos diversos amigos e colegas que além de auxiliarem direta ou indiretamente na execução desta tese, tornaram o convívio no laboratório sempre muito agradável e divertido;

Aos meus pais, sogro, sogra e toda a minha grande família pelo carinho e apoio em todos os momentos, incluindo os mais difíceis, possibilitando a realização do meu doutorado;

À minha esposa e filha que tornam a vida algo agradável e feliz;

A Deus por tudo o que tenho e por tudo o que sou.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (Proc. nº 02/12745-6) e apoio financeiro a este projeto (Proc. nº 04/14816-3).

PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “IN VITRO” E EM SIMBIOSE COM SOJA (*Glycine max* L. Merrill) ATRAVÉS DE MICROARRANJO DE DNA

RESUMO - O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade para a cultura da soja. Avanços nas pesquisas de melhoramento genético vegetal e microbiologia do solo permitiram expandir o uso de inoculantes comerciais contendo estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. Estas bactérias infectam as raízes da planta e induzem a formação de nódulos, que abrigam a forma bacteriíode, diferenciada da bactéria, responsável pela fixação simbiótica do nitrogênio. Informações sobre processos bioquímicos envolvidos no metabolismo da relação simbiótica podem ser adquiridas através de análises globais de expressão gênica. Para esta finalidade, destaca-se a tecnologia de microarranjo de DNA para detecção de genes diferencialmente expressos em larga escala. O objetivo geral deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos, por meio de microarranjos de DNA, em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 cultivada em diferentes meios de cultura, RDM (Rhizobia Defined Medium), TY (Tryptone-Yeast Medium) e YMB (Yeast-Mannitol Medium), e em bacteriíodes isolados de nódulos de soja em diferentes períodos de desenvolvimento, 13, 28 e 48 dias após inoculação. Para esta finalidade, a partir do seqüenciamento de DNA genômico de *B. elkanii*, um microarranjo (Be587) foi gerado contendo 2654 genes. Em meio RDM, a bactéria confrontou-se com a necessidade de se adaptar e sintetizar suas subunidades formadoras de macromoléculas a partir de uma única fonte de carbono, refletindo em um metabolismo mais ativo nas fases lag e log. Por outro lado, em meio TY, as células cultivadas na presença de uma boa fonte de carbono e energia cresceram rapidamente esgotando os recursos disponíveis no meio,

o que pode ter causado uma situação de estresse que se refletiu na identificação de um maior número de genes diferencialmente expressos. Em bacterióides das diferentes fases analisadas, foram detectados mais genes envolvidos na regulação do processo de nodulação e fixação do nitrogênio do que genes estruturais. Adicionalmente, um processo de ciclagem de nitrogênio orgânico pode estar envolvido nesta regulação, dado a detecção de um número de genes envolvidos em vias do metabolismo de aminoácidos.

Palavras-chaves: bacterióide, *Bradyrhizobium elkanii*, expressão gênica, microarranjo de DNA, metabolismo bacteriano, perfil transcricional.

**TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “IN VITRO”
AND IN SYMBIOSIS WITH SOYBEAN (*Glycine max* L. Merrill) ANALYZED BY DNA
MICROARRAY**

SUMMARY – Nitrogen is the most required nutrient by soybean culture. Advanced researches in genetic plant breeding and soil microbiology allowed the expansion in commercial inoculants applications containing strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*. These bacteria infect plant roots and induce nodule formation which home the differentiated bacteria, named bacteroid. The bacteroid in turn is responsible for symbiotic nitrogen fixation. Biochemical knowledge about processes of symbiotic regulation can be acquired by global analysis of gene expression. To achieve such information, the DNA microarray technology, used for detection of differentially expressed genes in large scale, was used. The purpose of this work was identify differentially expressed genes of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, grown under different media conditions, such as RDM (Rhizobia Defined Medium), TY (Tryptone-Yeast Medium) and YMB (Yeast-Mannitol Medium), and in bacteroids from soybean nodules at different developmental stages, 13, 28 e 49 days after inoculation. For this purpose, the DNA microarray Be587 with 2654 genes was generated from *B. elkanii* genomic DNA. In RDM medium the bacterium was confronted with the need of adaptation and building of macromolecules subunits from a single carbon source, what was reflected in a more active metabolism in lag and log phases. In turn, in TY medium with good carbon and energy sources the cells grew fastly and exhaust the medium sources available. Such condition can submitted the bacterial cells to a stress condition that reflected in the identification of higher number differentially expressed genes. At different bacteroids stages, the analysis detected genes related to nodulation and

nitrogen fixation regulation more than structural genes. Inasmuch, an organic nitrogen recycle might be involved on such regulation processes, based in detection of a significant number of genes involved in amino acid metabolism ways.

Key words: bacteroid, *Bradyrhizobium elkanii*, genic expression, DNA microarray, bacterial metabolism, transcriptional profile.

I. INTRODUÇÃO.

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], família *Fabaceae* (DELORIT & GUNN, 1986), é considerada uma das mais importantes fontes de proteínas e óleo vegetal, constituinte de seus grãos. O cultivar, somado às condições ambientais, determina o teor da composição destes constituintes na semente da planta. Ambos têm importância nutritiva, colocando a soja como uma das culturas significativas para o suprimento de alimentos para a crescente população mundial (PANIZZI & MANDARINO, 1994). No Brasil, a safra 2004/2005 atingiu uma produção de 51.451.5 mil toneladas em uma área plantada equivalente a 23.301.1 mil hectares (CONAB, 2006).

Devido ao elevado teor protéico que algumas sementes atingem aproximadamente 42% (PANIZZI & MANDARINO, 1994), consequentemente, um alto índice de nitrogênio é demandado pela cultura da soja. Uma das vantagens da cultura da soja, no Brasil, consiste na sua independência da adubação nitrogenada graças a sua inoculação com rizóbios, os quais têm o potencial de se estabelecerem no solo e suprir as necessidades da planta através da fixação simbiótica do nitrogênio (CATTELAN & HUNGRIA, 1994). A prática da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio traz grandes benefícios, reduzindo significativamente os custos de produção da soja em até um bilhão de dólares, além de não promover poluição do meio ambiente. Cerca de 50% de adubos nitrogenados aplicados ao solo são perdidos por desnitrificação e lixiviação, podendo acarretar problemas relacionados à redução na camada de ozônio e eutrofização de rios e lagos (MENDES & HUNGRIA, 2001).

Atualmente, quatro estirpes são recomendadas oficialmente para a utilização nos inoculantes comerciais: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019, *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Diferenças entre o genoma de

B. japonicum e *B. elkanii* devam existir, uma vez que a especificidade destas duas bactérias para hospedeiros mostra grande diferença.

Durante seu ciclo de vida, o rizóbio confronta-se com diversos desafios que refletem na regulação da expressão gênica. A bactéria de vida livre, no solo, existe como um saprófito competindo com outras bactérias para a sua subsistência. Quando encontra a rizosfera de uma planta, embora rica em nutrientes, a bactéria deve avaliar a compatibilidade do hospedeiro e competir com outros rizóbios, ou membros da própria espécie, para se introduzir na raiz e estabelecer a simbiose através da nodulação e fixação biológica do nitrogênio. Nesta etapa, seu ambiente muda rigorosamente e a bactéria deve adaptar-se a um novo estilo de vida intracelular na planta hospedeira (OKE & LONG, 1999; LOH & STACEY, 2003). Esta sucessiva alteração de ambientes, refletindo em alterações metabólicas, faz com que os estudos ecológicos e fisiológicos de rizóbios sejam de grande interesse para a pesquisa prática, aplicada a indústria comercial de inoculantes. A competição com bactérias indígenas no solo, para a nodulação, é considerada o principal fator limitante na exploração do uso de inoculantes na agricultura. Mesmo bactérias inoculadas previamente e naturalizadas, podem dar origem no solo a populações com baixa eficiência de fixação do nitrogênio (LÓPEZ-GARCIA et al., 2002).

Além das diferenças genéticas, o estado fisiológico do rizóbio na formulação do inoculante parece ser diferente do estado correspondente no solo, entre as diferentes populações. Por exemplo, em culturas de *B. japonicum* de alta titulação, um fator *quorum-sensing* produzido inibiu a expressão dos genes *nod* através da indução de *nolA* (LOH et al., 2001). LÓPEZ-GARCIA et al. (2001) apresentaram evidências de que condições de cultura privadas em nitrogênio, para *B. japonicum*, acentuam características iniciais de infecção e nodulação, no que se refere à eficiência de nodulação e competitividade contra culturas sem privação.

Uma vez que altas titulações de células viáveis são requeridas para a composição de inoculantes comerciais de rizóbios, o estado fisiológico dos inoculantes está próximo da fase estacionária e os mesmos são obtidos por meio de culturas ricas, na maioria das vezes. Os inoculantes comerciais podem ser turfosos ou líquidos,

embora haja uma tendência à utilização dos inoculantes líquidos, apresentado em embalagens que consistem de frascos plásticos, em formulações que mantêm as células viáveis durante o período de armazenamento. O período de validade dos inoculantes comerciais é de no mínimo seis meses após a fabricação, definido pela instrução normativa nº 5 de agosto de 2004 (MAPA, 2006). O procedimento de inoculação é realizado por aplicação direta na semente ou via sulco de plantio, tornando a aplicação mais prática e segura para o produtor. Em solos isentos de bradirrízobios, a aplicação de inoculantes para a cultura da soja deve ser realizada anualmente, pelo menos nos primeiros anos da cultura. Para que a fixação simbiótica seja eficiente, recomenda-se inocular as sementes todos os anos, em cada plantio, de forma que a nodulação ocorra com as estirpes presentes no inoculante e não com aquelas estabelecidas no solo, as quais podem apresentar baixa eficiência (JARDIM-FREIRE et al., 2006).

O acompanhamento do estado fisiológico de rizóbios de vida-livre, para a composição de inoculantes comerciais, ou durante o estabelecimento da simbiose torna-se importante para avaliação da eficiência dos processos de nodulação e fixação biológica do nitrogênio. Neste contexto, estudos genéticos de expressão gênica baseados em microarranjos de DNA podem ser muito úteis, dada à possibilidade de se observar um perfil genético com múltiplas marcas. O fato do seqüenciamento do genoma de *B. elkanii* 587 ainda estar em andamento, não impediu a construção de um microarranjo parcial de DNA genômico desta bactéria, para finalidades de análises de transcriptoma parcial e outras prospecções. Os resultados obtidos, até o momento, permitiram a seleção de 3104 clones de bibliotecas de “shotgun” de DNA genômico, para o desenvolvimento de um microarranjo parcial de DNA contendo 2654 genes. O grupo do LBMP (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas), sob chefia da Dra. Eliana G. M. Lemos, tem concentrado esforços neste projeto de seqüenciamento. Este interesse se dá devido à importância de *B. elkanii* 587 na composição de inoculantes comerciais para a cultura da soja (MAPA, 2006).

O objetivo deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, por meio de microarranjos de DNA. Abordagens

genômica e transcriptômica foram utilizadas para investigação do comportamento metabólico de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 em duas condições diferentes de cultivo. As respostas as diferentes condições nutricionais foram observadas nas fases lag, logarítmica e estacionária em meio complexo TY (“Tryptone-Yeast Medium”) e meio definido RDM (“Rhizobium Defined Medium”). Adicionalmente, as respostas às condições de simbiose durante os períodos de 13, 28 e 48 dias após inoculação foram avaliadas utilizando bacterióides de nódulos soja (*G. max*), inoculados com uma cultura bacteriana em meio YMB (“Yeast-Mannitol Medium”).

II. REVISÃO DE LITERATURA.

1. Estirpes de importância para inoculação da soja e levantamento taxonômico de rizóbios.

O século XX foi marcado por um crescimento populacional sem precedentes na história da humanidade. Segundo a ONU, a cada ano somam-se 86 milhões de novos habitantes ao planeta, e até 2015 a população mundial terá atingido entre 7,10 – 7,18 milhões de habitantes. A densidade populacional no Brasil será de aproximadamente 33 habitantes por Km² em meados deste século. Com esta densidade populacional e a extensão de terras cultiváveis que apresenta, o Brasil pode assumir importante posição como supridor de alimentos para o mundo, além de atender sua demanda interna. No entanto, para que esse potencial venha a ser aproveitado, a pesquisa e a tecnologia aplicada à área agrícola devem ser exploradas (PAVAN E FILHO, 1997).

A cultura da soja, durante a safra 2004/2005, ocupou 47,5% da área cultivada do país, tendo grande destaque no contexto agroeconômico atual (CONAB, 2006). Entre os fatores responsáveis pela expansão e competitividade desta cultura, destaca-se a sua capacidade em fixar nitrogênio atmosférico quando em simbiose com bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, dispensando a utilização de adubos nitrogenados (ARAÚJO, 1997).

A seleção das estirpes que devem compor os inoculantes comerciais para soja foi derivada do trabalho de muitos pesquisadores, em diversas instituições. A partir de 1985, um grupo formado por pesquisadores do Rio Grande do Sul fundou uma congregação que agrega também produtores de inoculantes e representantes do Ministério da Agricultura. Esta congregação tem se expandido e reúne-se, então, a cada dois anos, para analisar os resultados das pesquisas em seleção, recomendação

de estirpes, controle de qualidade e outros temas de interesse da rizobiologia. Em 1992, este grupo foi reconhecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e definido como RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Desde então, a FEPAGRO (Fundação de Pesquisa Agropecuária/RS) é a instituição responsável pela manutenção e distribuição das estirpes recomendadas, enquanto o MAPA legaliza e rege a legislação para a produção de inoculantes comerciais, em âmbito federal. Desde 1979, as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587, e depois de 1992, as SEMIA 5079 (CPAC 15) e a SEMIA 5080 (CPAC 7), foram incluídas na recomendação oficial de inoculantes comerciais para a cultura da soja (JARDIM-FREIRE & VERNETTI, 1999; JARDIM-FREIRE et al, 2006).

Os solos de Cerrado, que representam porção considerável da área de cultivo para soja, não possuíam estirpes de rizóbios capazes de nodular eficientemente esta cultura naquela região. Isto foi influenciado por diversos fatores abióticos e bióticos que modificavam os padrões de competitividade das estirpes de *Bradyrhizobium* spp.. Estirpes de baixa eficiência simbiótica interferiam no estabelecimento de outras estirpes nos nódulos, inoculadas através da semente, enquanto a ação de actinomicetos produtores de antibióticos, nativos nos solos de cerrado, alterava o percentual das populações de rizóbios resistentes a antibióticos (VARGAS et al., 1992; VARGAS et al. 1994). Por isso, a inoculação da cultura da soja com as estirpes atualmente recomendadas de bradirrizóbios foi imprescindível para o bom desempenho da lavoura da soja, na região de Cerrado (MENDES & HUNGRIA, 2001).

O primeiro rizóbio isolado, de um nódulo, e cultivado foi *Rhizobium leguminosarum*. Esta bactéria, que mantém o seu nome desde sua descoberta por Frank, em 1889, também foi denominada *Bacillus radicola* por Beijerinck, que a isolou quase que simultaneamente em 1890. Assim, surgiu o gênero *Rhizobium* que englobava todos os rizóbios conhecidos até 1982, quando ocorreu a identificação do gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982). Em seguida, surgiram os gêneros *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Sinorhizobium* (CHEN, 1988), *Mesorhizobium*

(JARVIS et al., 1997) e *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998). Todas as espécies de rizóbios, a princípio, eram classificadas dentro da família *Rhizobiaceae* baseado na habilidade em fixar nitrogênio. Atualmente, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (GARRITY, 2005), baseado na análise filogenética da sequência do 16S rDNA os seis gêneros de rizóbios estão distribuídos em quatro famílias, a saber: *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*) e *Hyphomicrobiaceae* (*Azorhizobium*). A base para os estudos de genética da fixação biológica do nitrogênio, nas associações simbióticas, foi constituída por bactérias destes gêneros descritos.

A espécie *Bradyrhizobium elkanii* foi determinada por KUYKENDAL et al. (1992). Esta bactéria, assim como *B. japonicum*, normalmente induz a formação de nódulos em espécies de plantas de soja (*Glycine*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Contudo, *B. elkanii* também induz nódulos em plantas do fenótipo não nodulante de soja *rjlrj1*, “black-eyed peas” (*Vigna*) e “mungbean”. RUMJANEK et al. (1993) classificou as estirpes brasileiras 29W (SEMIA 5019) e 587 (SEMIA 587) como pertencentes à espécie *Bradyrhizobium elkanii* baseado na similaridade de sequências 16S rDNA e reatividade de anticorpos contra sorogrupos de estirpes internacionais, USDA76 e USDA 31. Estas linhagens de *B. elkanii* brasileiras atualmente levam o prefixo da Seção de Micobiologia Agrícola (SEMIA) e fazem parte da coleção de rizóbios da FEPAGRO. Assim, a classificação sistemática atual da estirpe SEMIA 587, utilizada neste estudo, com a inclusão da nova família *Bradyrhizobiaceae* (GARRITY et al., 2006), pode ser observada no quadro abaixo:

Reino:	<i>Eubacteria</i>
Filo:	<i>Proteobacteria</i>
Classe:	<i>Alpha Proteobacteria</i>
Ordem:	<i>Rhizobiales</i>
Família:	<i>Bradyrhizobiaceae</i>
Gênero:	<i>Bradyrhizobium</i>
Espécie:	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>

2. Estruturas especializadas para a fixação biológica do nitrogênio.

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

A infecção de raízes de certas plantas leguminosas por bactérias fixadoras de nitrogênio resulta na formação de estruturas especializadas denominadas nódulos, onde se estabelece a simbiose rizóbio/leguminosa. Nestes nódulos, o nitrogênio atmosférico é reduzido às formas assimiláveis pela planta, as quais são transportadas para outros órgãos vegetais (KEEN, 1988). Os rizóbios no solo são atraídos em direção às raízes hospedeiras por um quimiotactismo positivo, devido à secreção de flavonóides pela planta. Um conjunto de genes das bactérias, conhecido como genes nod, é responsável pela expressão de fatores envolvidos no reconhecimento entre carboidratos de superfície bacteriana e lectinas nos pêlos radiculares de algumas plantas, desencadeando o processo de nodulação (DAZZO et al., 1984; MYLONA et al., 1995; DOWNIE, 1998) (Figura 1). Os fatores Nod são derivados de quito-oligossacarídeos, tetra ou pentâmetros de N-acetil-glicosamina. Eles agem como sinais mitogênicos que induzem divisões celulares no córtex da raiz levando a formação do meristema nodular (CRAWFORD et al., 2000; FERNANDEZ-PASCUAL et al., 2006).

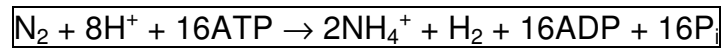
Os pêlos radiculares são extensões unicelulares de células epidérmicas que se desenvolvem próximo ao ápice da raiz. A porção posterior do pêlo, sentido do crescimento, apresenta alta atividade exocitótica e síntese de parede celular. Na rizosfera, os pêlos jovens desempenham papel importante no reconhecimento simbiótico, uma vez que os fatores Nod secretados pelos rizóbios estimulam a reorientação do crescimento da parede celular, resultando no seu encurvamento. Dentro dos pêlos encurvados, os fatores Nod promovem a formação dos cordões de infecção pelas quais as bactérias invadem as plantas. O cordão de infecção consiste

em um túbulo formado pela contínua coalescência de vesículas derivadas do Aparelho de Golgi. O cordão de infecção contendo um grande número de células de rizóbio cresce em direção ao primórdio do nódulo. Quando esta via alcança essas células, ela funde-se com a membrana da célula hospedeira. A via de infecção pode ramificar-se, de forma que várias células do hospedeiro sejam colonizadas por rizóbios (PERRET et al., 2000; LODWIG & POOLE, 2003) (Figuras 2 e 3).

Após o início do estabelecimento do nódulo radicular, e infecção das células por rizóbios, uma vesícula simbiótica organela-símile é subsequente formada através de divisões e diferenciações tanto da membrana vegetal como da bactéria. Esta estrutura é denominada simbiossoma ou unidade peribacterióide, nas quais as bactérias colonizadoras passam por um processo de diferenciação que gera a forma especializada na fixação de nitrogênio, o bacterióide. Os bacterióides são fenotipicamente diferentes quanto à forma e tamanho, dependendo do gênero relacionado ao rizóbio. A unidade peribacterióide de nódulos encontrados em raízes de feijão e soja contém vários bacterióides, envolvidos por uma membrana peribacterióide. Bacterióides maduros reduzem nitrogênio atmosférico através de um processo intensivamente energético, suprido pela provisão de carbono da planta. A regulação do metabolismo do bacterióide no ambiente nodular, com baixa tensão de oxigênio, requer um balanceamento preciso de energia, agentes redutores e “pools” de carbono para permitir taxas ótimas de fixação do nitrogênio (PAAU et al., 1980; VASSE et al., 1990; LODWIG & POOLE, 2003).

A disponibilidade de carbono da planta para os bacterióides ocorre na forma de ácidos dicarboxílico. Tanto a membrana bacterióide, como a membrana peribacterióide, regulam a troca de metabólitos, enquanto estes organismos passam a sintetizar nitrogenase e outras proteínas acessórias, como citocromos que atuam no ambiente de baixa tensão de oxigênio do nódulo, permitindo a fixação biológica do nitrogênio (OKE & LONG, 1999; CRAWFORD et al., 2000; LODWIG & POOLE, 2003).

Bacterióides sintetizam a enzima nitrogenase para catalisar a redução do dinitrogênio através da reação descrita no quadro a seguir (BURKS & BURRIS, 1941; BURRIS, 1974).



Diferenças entre os genomas de rizóbios distintos têm corroborado a enorme diversidade metabólica apresentada por eles. Isto inclui um grande número de genes metabólicos, alguns dos quais ligados a regiões ou ilhas simbióticas. O papel da maioria destes genes permanece desconhecido, enquanto investigações de transcriptoma e proteoma irão revelar mapas poderosos de expressão gênica. A diversidade metabólica de rizóbios provavelmente está relacionada à sobrevivência, crescimento e colonização da rizosfera da planta, assim como do desenvolvimento do cordão de infecção.

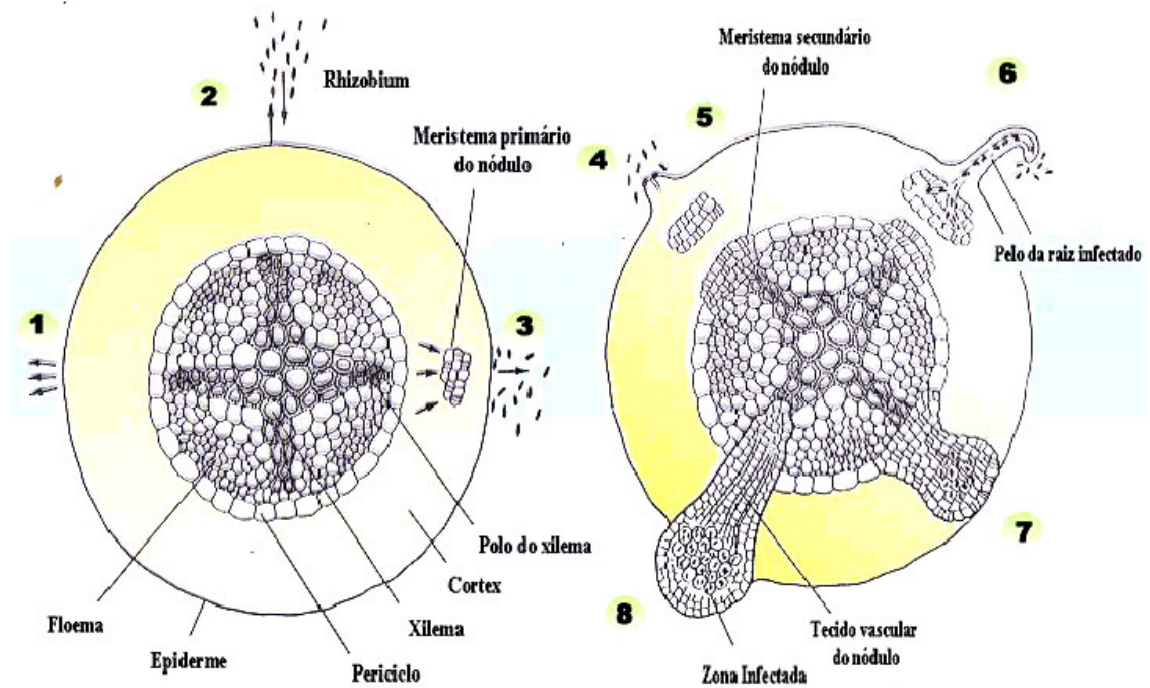


Figura 1: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios (www.plantphys.net).

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

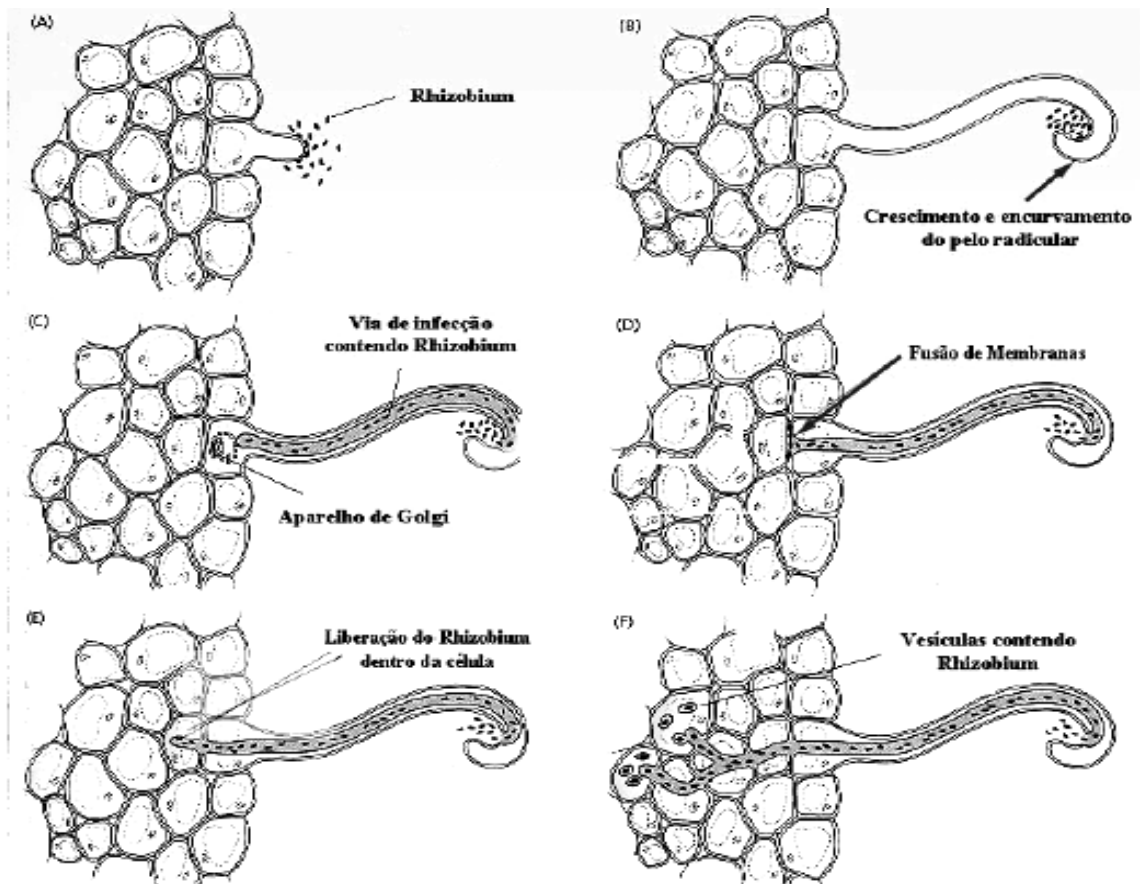


Figura 2: Detalhes das fases de infecção da raiz de uma planta pelo rizóbio (www.plantphys.net).

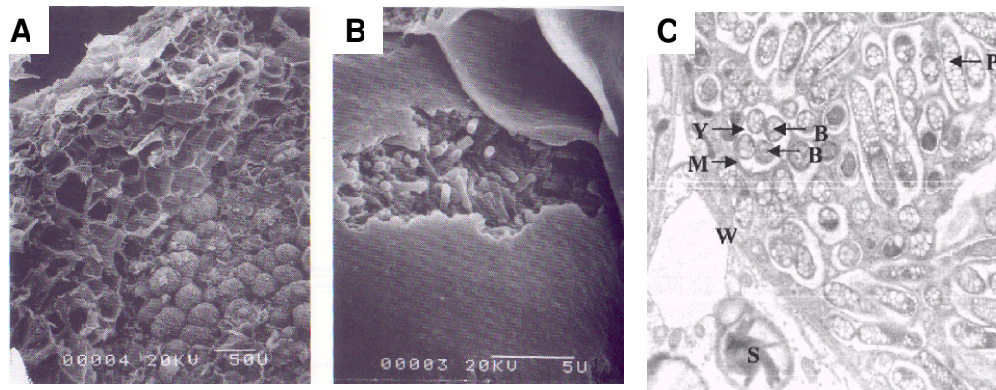


Figura 3: Células vegetais colonizadas por rizóbios. (A) e (B) Micrografias eletrônicas de varredura de nódulos “freeze-fractured” formados por *B. japonicum* em soja, mostrando a forma bastonete da bactéria em seu interior (KUYKENDAL, 2005). (C) Secção transversal de um nódulo determinado de feijão, como o de soja, mostrando a formação do simbiossoma. B - bacterióide; Y - espaço peribacterióide; M - membrana peribacterióide; W - parede celular vegetal, P - grânulo de PHB, S - amido (CRAWFORD et al., 2000).

3. Simbiose: Genes envolvidos na nodulação e fixação biológica do nitrogênio por rizóbios.

A expressão de genes específicos participa do desenvolvimento da simbiose planta/bactéria. Os genes envolvidos na formação dos nódulos radiculares são coletivamente chamados de genes de nodulinas, e estão divididos em duas classes. A primeira engloba 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*. 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 a formação do nódulo (BREWIN, 1991; LONG, 1996).

Em algumas espécies de rizóbios, os genes de nodulinas estão intimamente agrupados, enquanto em outras, eles podem estar dispersos por todo genoma, seja em cromossomos ou plasmídeos. Alguns destes genes são comuns para todas as espécies de rizóbios, como os *nodABC*, essenciais para a formação dos nódulos, enquanto outros são específicos para uma única espécie. Genes *nod* envolvidos na nodulação de um hospedeiro particular são denominados *hsn* (“host-specific nod”) (DESHMANE & STACEY, 1989; CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1991).

Os genes *nod* foram definidos, com auxílio de macro e micro simbiontes mutantes, pela habilidade das bactérias em formar nódulos em hospedeiros específicos. A expressão destes genes bacterianos é regulada por um ativador transcricional endógeno NodD, cuja indução se dá através da ação de isoflavonóides, como genisteína e daidzeína no caso de *B. japonicum* (KOSSLAK et al., 1987; PERRET et al., 2000).

Genes envolvidos na diferenciação bacterióide têm sido identificados através da análise de escrutínio de mutantes e estudos de expressão gênica. Entre eles, destacam-se os genes *hsfA*, *nolA* e *sipS* em *B. japonicum*; os genes *bacA*, *dctA*, *nex18/7* e *prsDE* em *Sinorhizobium meliloti*; os genes *glmS* e *prsDE* em *R. leguminosarum viciae*; e o gene *inv* em *Mesorhizobium loti*. Mutações nestes genes impedem a formação ou manutenção do bacterióide, resultando em nódulos Fix⁻, cujo fenótipo é ineficaz na fixação do nitrogênio (OKE & LONG, 1999).

Um 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. Além dos 20 genes *nif* estruturalmente homólogos aos de *Klebsiella pneumoniae*, mais genes diferentes foram identificados em rizóbios. Os genes *fix* foram assim denominados para identificar genes essenciais para fixação do nitrogênio, porém, que não apresentassem

cópias homólogas em *K. pneumoniae*. Eles constituem uma classe bastante heterogênea, incluindo genes envolvidos no desenvolvimento e metabolismo de bacterióides, além de genes envolvidos em processos não exclusivamente relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio e, inclusive, presentes em organismos não diazotróficos (FISCHER, 1994).

Os genes *fix* e *nif* de rizóbios estão organizados em clusters distintos, cuja estrutura e localização genômica são espécie específicas (VAN RHIJN & VANDERLEYDEN, 1995). Outros genes, envolvidos com funções do metabolismo celular intermediário central, também podem desempenhar papéis importantes durante a simbiose, embora não tenham sido denominados *fix*. Estes genes incluem os genes *dct*, envolvidos no transporte de ácidos dicarboxílicos, e *glyA* descoberto em *B. japonicum*, relacionado à biossíntese de glicina (ROSSBACH & HENNECKE, 1991; FISCHER, 1994).

Os genes *nifHDK* são os principais genes envolvidos na síntese do complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio. Estes genes, e outros genes *nif*, são controlados pelos elementos regulatórios FixL, FixJ, FixK, NifA e RpoN, através de cascatas de ativação integradas de forma espécie-específica diferentes. O controle dos genes para expressão da nitrogenase e funções acessórias envolvem um tipo de promotor especializado, com seqüências conservadas -24/-12, uma RNA polimerase contendo um fator σ^{54} único, codificado pelo gene *rpoN*, também denominado *ntrA*, e uma proteína ativadora codificada pelo gene *nifA* (FISCHER, 1994).

Uma variedade de mecanismos evoluíram para regular a transcrição do regulador NifA, dependente da concentração de oxigênio celular. Em *R. meliloti* (*S. meliloti*) e *Azorhizobium caulinodans* este controle envolve um sistema regulatório de dois componentes, FixL/FixJ, enquanto em *B. japonicum* a expressão *nifA* é autoativada pela percepção da baixa tensão de oxigênio. Consequentemente, em *S. meliloti* e *A. caulinodans* o controle dos genes da fixação é exercido em dois níveis, FixL/FixJ e NifA, enquanto em *B. japonicum* ele é limitado ao NifA (THÖNY et al., 1989). A proteína FixL, uma hemo-proteína quinase oxigênio sensível, é autofosforilada na ausência de O₂ e

fosforila FixJ, o qual, por sua vez, ativa a transcrição de outras proteínas regulatórias, como FixK e NifA (DAVID et al., 1988).

No gênero *Bradyrhizobium*, os genes envolvidos no evento de nodulação (genes *nod*), fixação do nitrogênio (genes *fix*) e síntese de nitrogenase (genes *nif*) estão localizados no cromossomo (DESHMANE & STACEY, 1989). Alguns dos genes de rizóbios com funções específicas, conhecidas ou deduzidas, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação de genes *nod*, *nol*, *noe*, *nif* e *fix* identificados em diferentes espécies de rizóbios (FISHER, 1994; HANCOCK, 2004; RHIZOBASE, 2006).

Genes <i>nod</i>		Genes <i>nol</i> (cont.)	
<i>nodA</i>	Aciltransferase	<i>nolW</i>	Sistema de secreção?
<i>nodB</i>	De-N-acetilase	<i>nolX</i>	Sistema de secreção?
<i>nodC</i>	Quitina sintase	<i>nolY</i>	Desconhecida
<i>nodD</i>	Ativador transcricional da família LysR	<i>nolZ</i>	Nodulação normal
<i>nodE</i>	Beta-cetoacil sintase	Genes <i>noe</i>	
<i>nodF</i>	Proteína Acil carreadora	<i>noeA</i>	Metil-transferase?
<i>nodG</i>	Beta-cetoacil redutase	<i>noeB</i>	Desconhecida
<i>nodH</i>	Sulfotransferase	<i>noeC</i>	Arabinosilação
<i>nodI</i>	Transporte de fatores Nod	<i>noeD</i>	Desconhecida
<i>nodJ</i>	Proteína de secreção de polissacarídeo capsular	<i>noeE</i>	Sulfatação de fucose
<i>nodK</i>	Desconhecida/Similar a <i>nodY</i>	<i>noeF</i>	Desconhecida
<i>nodL</i>	O-Acetiltransferase	<i>noeI</i>	O-Metiltransferase
<i>nodM</i>	D-glicosamina sintase	<i>noeJ</i>	Guanililtransferase
<i>nodN</i>	Desconhecida/Síntese de fator Nod	<i>noeL</i>	Desidratase
<i>nodO</i>	Hemolisina/Proteína formadora de poro	<i>noeK</i>	Fosfomanomutase
<i>nodP</i>	ATP-sulfurilase/APS-quinase	Genes <i>nif</i>	
<i>nodQ</i>	ATP-sulfurilase/APS-quinase	<i>nifA</i>	Regulador positivos dos genes <i>nif</i> , <i>fix</i> e outros
<i>nodR</i>	Desconhecida	<i>nifB</i>	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator
<i>nodS</i>	Metiltransferase	<i>nifD</i>	Subunidade alfa da MoFe-proteína da nitrogenase
<i>nodT</i>	Proteína de membrana/Transporte de fatores Nod?	<i>nifE</i>	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator
<i>nodU</i>	O-Carbamoiltransferase	<i>nifH</i>	Fe-proteína da nitrogenase
<i>nodV</i>	Sensor, família regulatória de dois componentes	<i>nifK</i>	Subunidade beta da MoFe-proteína da nitrogenase
<i>nodW</i>	Regulador, família regulatória de dois componentes	<i>nifN</i>	Envolvido a biossíntese do FeMo-cofator
<i>nodX</i>	Exopolissacarídeo ácido codificado por <i>exoZ</i>	<i>nifQ</i>	Processamento de molibdênio
<i>nodY</i>	Desconhecida	<i>nifS</i>	Cisteína desulfurase
<i>nodZ</i>	Fucosiltransferase	<i>nifU</i>	Desconhecida
Genes <i>nol</i>		<i>nifV</i>	Homocitrato sintase
<i>nolA</i>	Regulador positivo da família MerR	<i>nifW</i>	Desconhecida; requerido para completa atividade da Fe-Mo-proteína
<i>nolB</i>	Sistema de secreção?	<i>nifX</i>	Desconhecida
<i>nolC</i>	Nodulação	<i>nifZ</i>	Envolvido a biossíntese do FeS-cofator
<i>nolD</i>	Regulador?	Genes <i>fix</i>	
<i>nolE</i>	Proteína periplasmática	<i>fixABCX</i>	Requerido para atividade nitrogenase; FixX similaridade com ferredoxinas
<i>nolF</i>	Transporte	<i>fixNOQP</i>	Induzido microaerobicamente; citocromo oxidase ligada a membrana
<i>nolG</i>	Transporte	<i>fixGHIS</i>	Processo redox acoplado a bomba de cátion
<i>nolH</i>	Transporte	<i>fixLJ</i>	Sistema regulatório de dois componentes sensível ao oxigênio
<i>nolI</i>	Transporte	<i>fixK/fixK2</i>	Regulador transcricional
<i>nolJ</i>	Desconhecida	<i>Rm fixK'</i>	Cópia funcional de <i>fixK</i>
<i>nolK</i>	Epimerase/Desidrogenase?	<i>Bj fixK1</i>	Homólogo <i>fixK</i> de função desconhecida não essencial para fixação do nitrogênio
<i>nolL</i>	O-Acetiltransferase	<i>fixR</i>	Desconhecida e não essencial para fixação do nitrogênio
<i>nolM</i>	Atuação com <i>nodZ</i>	<i>nfrA</i>	Regulação de <i>nifA</i>
<i>nolN</i>	Desconhecida	<i>fixT</i>	Regulador transcricional
<i>nolO</i>	O-Carbamoiltransferase	<i>fixU</i>	Desconhecida
<i>nolP</i>	Desconhecida		
<i>nolQ</i>	O-Carbamoiltransferase		
<i>nolR</i>	Repressor de genes <i>nod</i>		
<i>nolS</i>	Desconhecida		
<i>nolT</i>	Sistema de secreção?		
<i>nolU</i>	Sistema de secreção?		
<i>nolV</i>	Sistema de secreção?		

4. Características estruturais e seqüenciais de genomas de rizóbios.

O genoma de *Rhizobium* sp. NGR234 consiste de três replicons: um plasmídeo simbiótico de 536 Kb (pNGR234a), um megaplasmídeo de mais de 2 Mb (pNGR234b), e um cromossomo de aproximadamente 3,5 Mb. Além do completo seqüenciamento de pNGR234a, uma coleção de seqüências randômicas dos outros replicons tem sido coletada. Em pNGR234a foi identificada a presença de 416 genes funcionais, incluindo 26 genes para nodulação e 26 genes para fixação do nitrogênio. A comparação com outros genomas revelou que 19 clusters gênicos compartilhados, com alta similaridade, com *R. meliloti* (*S. meliloti*) sugere que pelo menos 28% da informação genética pode ter sido adquirida a partir de um ancestral comum. Adicionalmente, foram identificadas 9 regiões altamente conservadas, com alta similaridade, entre *Agrobacterium tumefaciens* C58, *B. japonicum* USDA110, e *M. loti* MAFF303099, assim como 2 clusters altamente homólogos a regiões similares do fitopatógeno *Erwinia carotovora* (FREIBERG et al., 1997; STREIT et al., 2004).

GONZALEZ et al. (2003) revelaram o seqüenciamento completo e a anotação do plasmídeo p42d de *Rhizobium etli* CFN42. Este plasmídeo de aproximadamente 371,2 Kb contém 359 seqüências codificadoras. Genes para nodulação e fixação do nitrogênio, comuns a outros rizóbios, estão agrupados em uma região de 125 Kb. Comparações com outras seqüências revelaram uma falta de colinearidade entre os genomas de rizóbios, exceto para algumas unidades transcricionais. Existem apenas 20 genes simbióticos que foram compartilhados por todos os rizóbios, cujas seqüências foram comparadas.

O primeiro rizóbio, ou bactéria do solo membro da classe Alpha-Proteobacteria, a ter sua estrutura genômica inteira determinada foi *Mesorhizobium loti* MAFF303099. A seqüência completa mostrou que seu genoma consiste em um único cromossomo de 7 Mb e dois plasmídeos, pMLa de 351,9 Kb e pMLb de 208,3 Kb. O cromossomo contém 6752 genes codificadores de proteínas, além dos genes para RNAs ribossômicos e transportadores. Dos genes funcionais, 54% mostraram similaridade com genes de funções conhecidas. Um segmento de DNA de 611 Kb foi identificado como uma

possível ilha simbiótica, contendo 30 genes para fixação de nitrogênio e 24 genes para nodulação. Os genomas dos plasmídeos pMLa e pMLb contêm, respectivamente, 320 e 209 genes potenciais para diferentes funções biológicas. Contudo, apenas um único gene plasmideal para nodulação foi identificado (KANEKO et al., 2000).

O genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 também foi completamente seqüenciado, consistindo em um cromossomo de 3,7 Mb e dois plasmídeos, pSymA de 1,4 MB e pSymB de 1,7 Mb. Foram estabelecidos 6204 genes funcionais, sendo que 59,7% podem ter suas funções determinadas por comparações em bancos de dados. O cromossomo de *S. meliloti* é típico de bactérias aeróbicas heterotróficas. O plasmídeo pSymB amplia os potenciais metabólicos permitindo que a bactéria metabolize uma variedade de pequenos compostos encontrados no solo ou na rizosfera da planta, além de permitir a síntese de polissacarídeos envolvidos na colonização do hospedeiro. O plasmídeo pSymA contém a maioria dos genes relacionados à nodulação e fixação do nitrogênio, conferindo a capacidade para a bactéria colonizar ambientes de baixa tensão de oxigênio e metabolizar uma variedade de formas químicas de nitrogênio, inclusive a forma molecular N₂ (GALIBERT et al., 2001).

A comparação entre os genomas de *S. meliloti* e *M. loti*, a região cromossomal de 410 Kb de *B. japonicum* e o plasmídeo simbiótico de 536 Kb de *Rhizobium* sp. permite algumas conclusões, a saber: 1) 35% dos genes de *M. loti* não apresenta equivalentes em *S. meliloti*; 2) as informações genéticas carregadas nos plasmídeos pSymA e pSymB em *S. meliloti* encontram-se dispersas no genoma de *M. loti*; 3) *M. loti* contém ilhas simbióticas, além dos genes de nodulação e fixação de nitrogênio, que não têm equivalente em *S. loti*; 4) *S. meliloti* não apresenta um sistema de secreção do tipo III, comum aos outros gêneros; e 5) 54% dos genes no plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* sp. não apresentam equivalentes em *S. meliloti*. Tomadas juntas, estas observações indicam que rizóbios diferem significativamente quanto ao conteúdo e organização gênica, independente de suas relações taxonômicas e hábitos simbióticos (GALIBERT et al., 2001).

O mapa genético e físico parcial do genoma de *B. japonicum* USDA110 foi estabelecido, mostrando que os genes *nod* e *nif* estão agrupados em uma região

cromossômica de 410 Kb (KÜNDING et al., 1993). Posteriormente, esta porção cromossômica teve sua seqüência de nucleotídeos revelada confirmando que nela estavam contidos todos os genes para nodulação, exceto *nodM*, e fixação de nitrogênio. Nesta região, 388 ORFs foram selecionadas como regiões codificadoras de proteínas, das quais 35% mostraram similaridade com proteínas de rizóbios. Foram encontrados genes que codificam sistemas de transporte de citrato férrico, molibdato e fontes de carbono, além de proteínas externas de membrana, sistemas de secreção do tipo III e enzimas modificadoras da parede celular (GÖTTTFERT et al., 2001).

Bradyrhizobium japonicum USDA110, originalmente isolada de nódulos de soja (*Glycine max*) na Flórida, EUA, em 1957, teve seu genoma completamente seqüenciado em 2002. Seu genoma consiste de um único cromossomo circular de 9.105.828 pb de comprimento, com um conteúdo médio de GC de 64,1%. Nenhum plasmídeo foi detectado. O cromossomo contém 8317 genes codificadores de proteínas, um conjunto de genes rRNA e 50 genes tRNA. Dos potenciais genes codificadores de proteínas, 52% mostraram similaridade de seqüência com genes de função conhecida, enquanto 30% com genes hipotéticos. Os 18% restante aparentemente não apresentaram similaridade com genes descritos (KANEKO et al., 2002a; KANEKO et al., 2002b).

Análise comparativa de genomas revelou que 34% dos genes de *B. japonicum* USDA110 mostraram similaridade de seqüência significativa tanto com *M. loti* como *S. meliloti*, enquanto 23% foram únicos para *B. japonicum*. Uma presumível ilha simbiótica de 681 Kb foi identificada. Esta região inclui uma porção de 410 Kb descrita por GÖTTTFERT et al. (2001), que contém 645 genes codificadores de proteínas, dos quais 301 tiveram suas funções deduzidas incluindo aqueles relacionados à fixação simbiótica do nitrogênio (KANEKO et al., 2002a).

A identificação de genes e a elucidação de mecanismos envolvendo os processos de infecção e nodulação por rizóbios, a diferenciação em bacterióide e fixação biológica de nitrogênio têm grande interesse agrônomo. Este conhecimento, associado à visão futurista da biotecnologia de plantas, gera uma perspectiva excitante

para o aproveitamento de plantas refratárias à nodulação, através da engenharia genética e transformação de plantas.

5. Análise da expressão gênica e microarranjos de DNA.

Vários métodos para a análise de expressão gênica, relacionada à identificação de transcritos de RNA, têm sido descritos, destacando-se: “Northern blot” (ALWINE et al., 1977); análise de proteção contra RNase (ZINN et al., 1983); “Differential Display” (LIANG & PARDEE, 1992); RNA “fingerprinting” por PCR (WELSH et al., 1992); RDA (“Representational Difference Analysis”) (LISITSYN et al., 1993); SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”) (VELCULESCU et al., 1995); produção em larga escala de ESTs (“Expressed Sequence Tag”) a partir de bibliotecas de cDNA (HILLIER et al., 1996); e RT-PCR quantitativo em tempo real (“Real time” RT-PCR) (LEE et al., 1993; LIVAK et al., 1995).

A tecnologia dos macro e microarranjos de DNA consiste em uma forma de análise de transcritos de genes específicos nas populações de mRNAs expressos, usando o princípio da hibridização. Esta técnica de alta densidade de genes, preparados por impressão robótica de DNAs sobre membranas de nylon (macroarranjos) ou lâminas de vidro (microarranjos), prevê a hibridização dos mesmos com cDNAs marcados radioativamente ou fluorescentemente. Assim, torna-se possível monitorar a expressão diferencial de genes em populações ou condições diferentes. Uma vez que milhares ou dezenas de milhares de fragmentos gênicos podem estar presentes, informações para genomas inteiros podem ser adquiridas em um único experimento de hibridização (SCHENA et al., 1995; LOCKHART et al., 1996; LIPSHUTZ et al., 1999). A Figura 04 ilustra um processo experimental básico de microarranjo de DNA.

O potencial dos microarranjos de DNA para estudos de resposta transcricional de muitos organismos, em resposta a alterações genéticas e ambientais, tem sido eficientemente demonstrado nos últimos 5 anos. O emprego desta técnica tem mostrado grande avanço nos estudos de expressão gênica em vegetais, humanos,

diversos gêneros de bactérias e leveduras. Em relação a sistemas microbianos, áreas como fisiologia, patogênese, epidemiologia, ecologia, filogenia, vias de manipulação e otimização da fermentação tornaram-se tópicos comuns de aplicação de microarranjos de DNA (YEO et al., 2001). O uso de microarranjos de DNA vem se expandindo para novos campos e novas aplicações, especificamente no que se refere à microbiologia ambiental (LETOWSKI et al., 2003). DHARMADI & GONZALEZ (2004) apresentaram uma revisão das aplicações de microarranjos de DNA nos estudos de sistemas bacterianos, focando as áreas de: resposta bacteriana a mudanças ambientais; identificação gênica, organização genômica e regulação transcricional; e engenharia genética e metabólica.

A validação dos dados obtidos em análises de microarranjos torna-se cada vez mais necessária e criteriosa, uma vez que além do grande volume de dados obtidos, os mesmos são analisados de forma integrada fornecendo padrões globais de transcriptoma, para determinados sistemas biológicos. A ferramenta de PCR quantitativa em tempo real surgiu como uma tecnologia eficiente para validação de dados de arranjos devido algumas características como, quantificação, rapidez e economia de RNA, utilizando até 1000 vezes menos RNA que nos ensaios convencionais (RAJEEVAN et al., 2001).

S. meliloti teve seu transcriptoma analisado através de macroarranjo, contendo 214 genes. Neste trabalho foram monitoradas dez condições ambientais, incluindo condições aeróbicas e microaeróbicas de vida livre, adição do indutor simbiótico luteolina e uma variedade de condições simbióticas. Macro e microssimbiontes mutantes foram envolvidos neste estudo e os resultados permitiram a identificação de novos genes, 5 induzidos por luteolina e 9 induzidos em bacterióides maduros. Várias classes de genes foram diferencialmente expressas durante a simbiose. Estes genes estavam relacionados à invasão, proteção contra estresse oxidativo, mobilização de ferro e sinalização, enfatizando possíveis mecanismos comuns entre simbiose e patogênese (AMPE et al., 2003). BECKER et al. (2004) também monitorou a expressão gênica de *S. meliloti* através de macro e microarranjos de DNA. Padrões de transcriptoma em resposta a limitação de oxigênio indicaram que até 5% dos genes

estudados, em um total de 6046 ORFs, foram regulados pela concentração de oxigênio. Transcriptomas de bacterióide e bactéria vida livre em condição microaerofílica se sobrepuseram parcialmente, levando os autores a conclusão de que O₂ contribui de forma limitada para o controle da expressão gênica simbiótica.

Utilizando um macroarranjo de DNA para *M. loti*, UCHIUMI et al. (2004) monitoraram e agruparam a dinâmica transcricional da bactéria durante simbiose, microanaerobiose e privação de nutrientes. Muitos genes para transposase, presentes na ilha simbiótica, tiveram elevada expressão em bacterióides, assim como os genes *nif*, *fix*, *fdx* e *rpoN*. A região genômica contendo os genes *fixNOPQ*, fora da ilha simbiótica foi marcadamente expressa tanto em microanaerobiose como em condições simbióticas. Os dados de simbiose mostraram ainda ativação do metabolismo de aminoácidos e elevada expressão dos genes *nif* e *fix*. Em contraste, genes para síntese de parede celular, divisão celular, replicação do DNA e produção de flagelo foram fortemente reprimidos em bacterióides diferenciados.

Recentemente, um microarranjo piloto do genoma parcial de *B. japonicum* foi desenhado, para estudar padrões transcricionais desta bactéria. Células selvagens em aerobiose e microaerobiose, e mutantes *regR* e *nifA*, respectivamente em aerobiose e microaerobiose, foram utilizados nesta investigação. Vários genes inéditos foram identificados como membros dos regulons *RegR* e *NifA* (HAUSER et al., 2006).

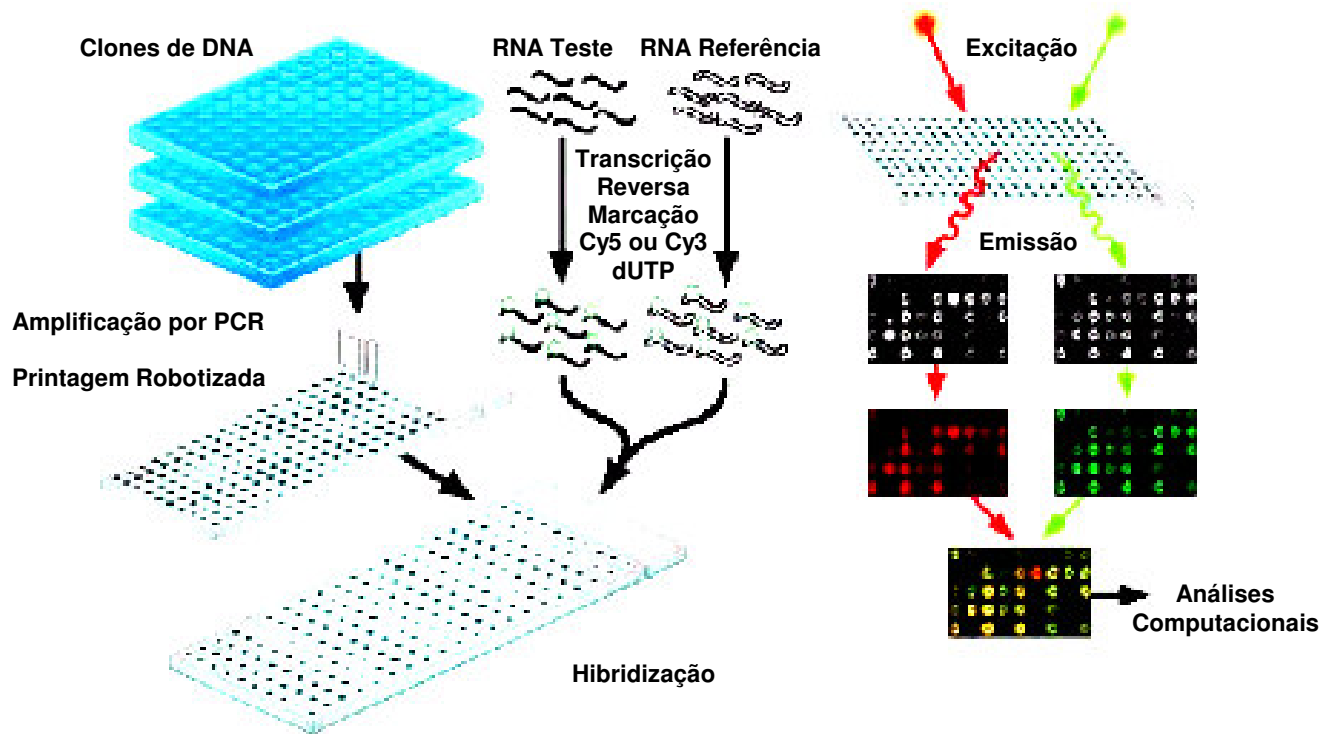


Figura 4: Esquema ilustrativo dos procedimentos da técnica de microarray de DNA (<http://phys.chem.ntnu.no/~bka/images/MicroArrays.jpg>).

III. MATERIAL E MÉTODOS.

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor dos Kits ou reagentes, foram baseados em SAMBROOK et al. (1989). Os meios de cultura e algumas soluções são apresentados no Apêndice deste trabalho. As técnicas empregadas neste projeto não ofereceram risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

Parte I – Genômica: Construção das bibliotecas plasmideais Be587 e seqüenciamento.

1. Estirpe bacteriana, cultivo e extração de DNA genômico.

Foi utilizada a estirpe *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 como objeto de estudo. As células foram cultivadas em meio complexo TY (“Tryptone-Yeast Medium”) (Beringer, 1974) durante 48 hs a 28°C, sob agitação a 140 rpm. A suspensão contendo bactérias foi centrifugada a 12000xg por 30 min, a 4°C. O sedimento foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. Em seguida, foram efetuados os processos de lise celular e degradação de RNA, através do tratamento com 500 µL de lisozima (5 mg/mL), 500 µL de solução SDS 20% e 15 µL de RNase (10 mg/mL). Para limpeza da fase aquosa, contendo o DNA, foram realizadas extrações com a mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio-álcool isoamílico, no volume 1:1 da amostra. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 95% (gelado) e, após sedimentação a 5860xg por 20 min, a 4°C, foi lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado). O DNA obtido foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 250 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1

mM EDTA). Após eluição do DNA genômico, o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro e teve sua integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. Estoques de DNA foram mantidos a -20°C.

2. Construção da biblioteca plasmideal de “shotgun” Be587.

2.1. Fragmentação mecânica, precipitação e reparo “blunt-end” dos terminais dos fragmentos gerados a partir do DNA genômico.

Foram utilizados 50 µg de DNA em solução de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 15 mM e glicerol 25% (v:v) esterilizado, para ser nebulizado por gás nitrogênio sob pressão de 3 Kgf/cm², durante 30 ou 40 seg. Em seguida, o nebulizador foi adaptado a um tubo de centrífuga (GSA – Sorvall) e centrifugado por 2 min a 162xg, 4°C, para concentrar a amostra no fundo do nebulizador e recuperá-la. A amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, para proceder-se a precipitação do DNA fragmentado na presença de 0,1 volume de Acetato de sódio 3M, pH 5,2, 4 µL de glicogênio (20 mg/mL), como carreador, e 1 volume de isopropanol absoluto (gelado). Após sedimentação e lavagem do sedimento, o mesmo foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água ultra-pura. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 0,8% para checagem do tamanho dos fragmentos obtidos e quantificação, na presença de pGEM 50 / 100/ 200 ng. Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase (bacteriófago T4) e Klenow DNA polimerase (*E. coli*) foi utilizada para o reparo “blunt-end” dos fragmentos. Para cada 10 µg de DNA fragmentado, foram utilizados 20U de cada enzima, acrescentando-se MgCl₂ 5 mM e dNTPs 500 µM. O tratamento com cada enzima foi realizado sucessivamente, de forma independente, por 15 min para cada reação, no mesmo tubo à temperatura ambiente.

2.2 Modificação dos terminais dos fragmentos para clonagem em vetor plasmideal.

Tendo em vista a utilização de dois tipos de vetores de clonagem, a modificação dos fragmentos de DNA se deu conforme o caso: 1) Desfosforilação para clonagem em vetor pCR[®]4Blunt-TOPO (Invitrogen) e 2) Fosforilação para clonagem em vetor pUC19DNA/*Sma*I (Fermentas). No primeiro caso, desfosforilação, foram utilizados 5U da enzima CIP (Fosfatase alcalina intestinal de bezerro), que remove grupos 5'-P dos fragmentos de DNA reparado. A reação de desfosforilação foi realizada diretamente no tubo contendo a reação de reparo "blunt-end", uma vez que as reações são compatíveis, segundo o fornecedor (Invitrogen). A reação foi incubada a 37 °C, durante 60 min, e a 65 °C, por 5 min, para inativação da enzima. No segundo caso, fosforilação, foram utilizados 10U de T4 polinucleotídeo quinase, enzima que catalisa a transferência de γ -P do ATP (adenosina 5'-trifosfato) para o terminal 5'-OH dos fragmentos de DNA. Neste caso, a reação se deu após precipitação dos fragmentos de DNA reparados, na presença de ATP 2,5 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min. A reação foi inativada por tratamento com calor a 65 °C por 5 min.

2.3. Obtenção dos insertos no tamanho desejado, recuperação e eluição a partir de gel de agarose.

Uma vez que os fragmentos de DNA foram reparados e modificados, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose "Low Melt Point" 0,8%, com tampão TBE, isento de brometo de etídio, durante 2 hs a 90 V. Ao lado das amostras, das reações de modificação, foram aplicados um marcador de tamanho do DNA (1 Kb DNA "ladder" – Invitrogen) e uma alíquota da amostra de interesse para documentação e auxílio no processo de eluição. Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando duas porções de gel, uma contendo os insertos a serem recuperados e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que contém o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob um

transiluminador. O padrão de bandeamento serviu como guia para obtenção dos insertos a partir da porção não corada do gel, colocando-se ambas as partes lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado, 600 – 2000 pb, foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em microtubos de 1,5 mL, aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os tubos contendo os fragmentos de gel de agarose foram incubados em banho a 65°C, durante 15 min. Os fragmentos selecionados de DNA foram eluídos do gel empregando-se o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences).

2.4. Clonagem dos insertos em vetores plasmideais e transformação de células competentes, hospedeiras de vetores recombinantes.

2.4.1. Reações de ligação.

Foram utilizados os vetores pCR[®]4Blunt-TOPO (Invitrogen) e pUC19DNA/*Sma*I (Fermentas). Entre as demais características específicas de cada plasmídeo, ambos apresentam resistência a ampicilina e permitem a seleção histoquímica de recombinantes. Para clonagem em pCR[®]4Blunt-TOPO foi efetuada reação contendo aproximadamente 100 ng de DNA, 1 µL de solução salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M) e 1 µL do vetor, misturados gentilmente. A reação foi incubada à temperatura ambiente (25°C) por no mínimo 3 hs. Para clonagem em pUC19DNA/*Sma*I foi efetuada ligação com relação de concentração DNA insertos:vetor na proporção [4:1]. A reação foi executada em um volume de 20 µL contendo 400 ng insertos Be587, 100 ng de vetor (Fermentas), 2 µL de tampão ligase [10x] e 20 U de T4 DNA ligase (N.E. Biolabs), misturados gentilmente, incubando-se a 16°C por aproximadamente 16 hs.

2.4.2. Transformação de células competentes por choque térmico, seleção e estoque de clones recombinantes.

Em tubos (Falcon) de 15 mL, foram adicionados volumes entre 4 – 20 µL dos produtos das reações de ligação. Foram acrescentados 50 µL de uma suspensão de células competentes, *Escherichia coli* DH5α, aos produtos de ligação, misturando-se gentilmente e incubando-se em gelo por 20 min. Os tubos foram então imediatamente aquecidos em banho a 42°C, sem agitação, por 90 seg, para proceder-se o choque térmico. Após esse período, os tubos devem retornar rapidamente ao gelo e permanecer por 2 min. Em seguida, foram adicionados 950 µL de meio SOC à suspensão, incubando-a a 37°C, com agitação de 220 rpm, durante 1,5 h. As células (100 µL/placa) foram então cultivadas em 10 placas preparadas com meio LB sólido, acrescido com 50 µg/mL de antibiótico ampicilina (Ap), 100 µL/placa do indutor IPTG (100 Mm) e 100 µL/placa do substrato X-Gal (40 mg/ml em dimetil-formamida). As placas foram incubadas a 37°C por um período aproximado de 18 hs. Para transformações envolvendo o vetor pCR[®]4Blunt-TOPO não há necessidade do indutor.

Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca, recombinantes. Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio CG (“CircleGrow”) + 50 µg/mL de Ap. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 37°C por 24 hs. Após esse período, foram adicionados 125 µL de solução de glicerol 40% (v:v). Estas placas constituíram o estoque de clones das bibliotecas Be587 que foram armazenadas a -80°C. Todos os clones oriundos de uma mesma extração de DNA constituem-se numa mesma biblioteca. Os clones selecionados da biblioteca de “shotgun” foram submetidos ao seqüenciamento automático de DNA.

3. Seqüenciamento de DNA dos clones da biblioteca de “shotgun”.

3.1. Cultivo dos clones recombinantes e extração de DNA plasmideal.

O DNA plasmideal foi extraído da seguinte maneira. Foram inoculados 10 µL de cada clone em 1mL de meio CG, contendo 50 µg/mL de Ap. As placas foram incubadas com agitação de 230 rpm, a 37°C, por 24 hs. Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 5 min a 3220xg e o sedimento foi ressuspensionado em 240 µL de solução GTE (50 mM glicose; 23 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA). Foram efetuados os processos de lise celular e degradação de RNA aplicando-se a solução de lise (NaOH 0,2 N/SDS 1%) e 50 µg de RNase, seguido do tratamento com 80 µL de Acetato de potássio 3 M e incubação por 10 min, a temperatura ambiente, e 30 min, a 90°C. Após resfriamento das placas em gelo, as mesmas foram centrifugadas a 3220xg, a 20°C, por 10 min. Todo o lisado obtido foi transferido para placas Millipore, providas de filtro, e acopladas em placas de polipropileno novas. Este conjunto foi centrifugado por 10 min a 3220xg, a 20°C. Foram adicionados 110 µL de isopropanol absoluto, gelado, à solução filtrada, para precipitação do DNA. O material foi misturado 30 vezes por inversão e as placas foram centrifugadas a 3220xg por 45 min, a 20°C. O DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%, gelado. As placas foram centrifugadas por 10 min nas mesmas condições de rotação e temperatura já descritas. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco em temperatura ambiente por 60 min. O DNA foi ressuspensionado em 30 µL de água ultra-pura e estocado a -20 °C.

3.2. Reação de PCR, seqüenciamento e análise.

As reações de PRC para seqüenciamento foram efetuadas em um volume de 20 µL contendo 100 ng de DNA, 2 µL de iniciador “forward” ou “reverse” (M13-pUC #1211-F ou #1201-R), 1 µL de Big Dye (“Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready

Reactions” - Perkin Elmer Biosystems) e 2 µL de tampão de reação. A reação foi conduzida em termociclador com os seguintes ciclos: 2 min a 96°C para uma desnaturação inicial e 40 ciclos de 10 seg a 96°C (desnaturação), 20 seg a 52°C (pareamento) e 4 min a 60°C (amplificação). Após a amplificação, as amostras foram precipitadas com 80 µL de isopropanol 75% e lavadas com 150 µL de etanol 70% gelado. Após secarem em temperatura ambiente, as amostras foram ressuspensas e desnaturadas com 9 µL de Hi-Di-Formamida a 95°C, por 5 min, e submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho 3700 DNA Analyzer ABI Prism (Perkin Elmer Biosystems).

4. Análise das seqüências geradas utilizando ferramentas de bioinformática.

Após o seqüenciamento, os dados brutos dos eletroferogramas de seqüências de DNA foram analisados pelo programa PhredPhrap (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998) e Consed (GORDON et al., 1998) a fim de gerar seqüências FASTA e avaliar a qualidade e alinhamento das mesmas. Valores de phred acima de 20 foram considerados de alta qualidade. As seqüências FASTA foram submetidas ao “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), através do programa BLASTN, para comparação com seqüências homólogas de nucleotídeos depositadas no banco de dados.

A biblioteca Be587 foi analisada em busca de possíveis ORFs, procurando os melhores seqüências para seleção de clones que foram utilizados na montagem do microarranjo Be587. Durante este processo foi utilizado o programa desenvolvido no LBMP pelo bioinformata Maurício Egídio Cantão (CANTÃO et al., 2006). O consenso das seqüências foi comparado também com outros genomas de rizóbios já seqüenciados, depositados no RhizoBase.

Parte II – Microarranjos de DNA: Confecção, hibridização e análise.

1. Construção dos microarranjos de DNA.

Os clones da biblioteca de “shotgun” selecionados para composição dos microarranjos tiveram seu DNA independentemente amplificado por PCR. Para cada clone, 20 µL de reação de PCR contendo 25 ng de DNA plasmideal molde, 200 µM dNTPs, 5 pmoles de oligonucleotídeos M13 “forward” e “reverse” (5'-CCCAGTCACGAGTTGTGTAAACG e 5'-AGCGGATAACAATTTTCACAGG, respectivamente), MgCl₂ 1,5 mM, DMSO (Dimetilsulfóxido) 0,5%, tampão de reação [1x] e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Quarenta ciclos de desnaturação a 96°C por 20 seg, pareamento a 50°C por 30 seg e extensão a 72°C por 4 min, seguido por 5 min de extensão final a 72°C, foram efetuados. Dos produtos de amplificação de cada clone, 15 µL, correspondendo a cerca de 3 µg de DNA, foram dispostos em placas de poliestireno de 96 poços e misturados ao mesmo volume (1:1) com DMSO. As amostras de DNA obtidas foram impressas em lâminas de vidro CMT-GAPS2 (Corning) em duplicata usando um GMS-417 Arrayer (Affymetrix).

Além dos genes de *B. elkanii* selecionados, o microarranjo que foi gerado continha 05 controles negativos (Apêndice), genes humanos e de plantas gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Manoel Victor F. Lemos (FCAV/UNESP). O microarranjo também continha controles experimentais do kit “Lucidea Universal ScoreCard” (Amershan Biosciences), que consistem em 23 genes artificiais originados de sequências de DNA de regiões intergênicas de levedura. Estes controles servem para validação, filtragem e normalização dos dados obtidos com o microarranjo.

2. Isolamento de RNA total.

Para obtenção do RNA bacteriano, as células foram coletadas a partir das condições cuja expressão gênica se queria avaliar, seja vida livre ou simbiose. 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, redissolvido com água, tratado com DNase I e re-purificado. A avaliação da qualidade do RNA isolado deu-se através de eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante, contendo 18% (v:v) de formaldeído 37%.

3. Síntese de cDNAs fluorescentemente marcados.

Foi empregada a técnica de marcação direta do cDNA durante a transcrição reversa, utilizando os fluoróforos Cy3 (verde) e Cy5 (vermelha). Para marcação, 15 µg de RNA total de cada amostra foi misturado a 40 U de RNAsin (Promega), inibidor de RNase; 15 µg de “random hexamer primers”, pd(N)₆ (Amershan Bioscience); e 1 µl dos controles de mRNAs sintéticos “spike” Ref ou Test (Amershan Biosciences), para amostras de Cy3 ou Cy5, respectivamente. 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 “first strand buffer” [5x] (Invitrogen), 2 µL de DTT 100 mM, 2 µL de dNTP mix (5 mM dATP, dGTP, dCTP; 2 mM dTTP), 1 µL de Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP 25 µM (Amershan Pharmacia Biotech), e 200 U da transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen). A síntese do cDNA foi efetuada a 37°C durante 3 hs, na ausência de luz, e o RNA molde foi posteriormente hidrolisado através da incubação com 5 µL de NaOH 1M a 37°C por 40 min. A reação foi neutralizada pela adição de 12,5 µL de Tris-HCl 1M, pH 7,5. A amostra contendo cDNA marcado foi então purificada em coluna tipo Microcon YM-100 (Millipore).

4. Hibridizações.

Os pares de cDNA marcados foram misturados a 37,5 µL de solução de hibridização, contendo 8 µL de líquido bloqueador RPN3601 (Amershan), 19 µL de SSC

[20x] e 5,5 µl de SDS 2%, e pré-desnaturados a 95 °C por 2 min. A hibridização ocorreu na estação “GeneTac Hybridization” (Genetic Microsystems), na qual as lâminas de vidro do microarranjo foram acopladas. Cada mistura de cDNA foi distribuída sobre a lâmina e hibridizada a 42 °C durante 12 hs. Após hibridização, a lâmina foi lavada automaticamente e sequencialmente em SSC [2x]/SDS 0,5%, SSC [0,5x] e SSC [0,05x], a 25 °C. Cada lavagem corresponde a um período de 15 min, com 10 seg de fluxo e 20 seg de incubação, durante 10 ciclos. O período de secagem da lâmina foi de 15 min. Foram utilizadas três lâminas para cada experimento, ou seja, extrações de RNA, síntese de cDNAs marcados e hibridizações foram realizadas em triplicata para cada ensaio executado.

5. Obtenção das imagens e análise dos dados.

Os sinais fluorescentes foram escaneados pelo GMS-418 “Arrayer Scanner” (Affymetrix). As leituras foram feitas sob diferentes comprimentos de onda, para permitir a excitação dos marcadores fluorescentes contidos nos cDNAs: 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5).

As imagens TIFF resultantes para cada fluoróforo, Cy3 ou Cy5, foram reunidas em uma sobreposição e analisadas, determinando-se a densidade “pixel” (intensidade) para cada “spot” no microarranjo, utilizando-se o programa ImaGene 5.5 (Biodiscovery). Uma grade de círculos independentes, correspondentes a cada “spot” de DNA nos arranjos, foi desenhada sobre a imagem para designar cada “spot” a ser quantificado. A quantificação foi calculada pela mediana da intensidade de todos os pixels referentes ao sinal de hibridização de cada “spot”. Os “pixels” classificados como “background” foram automaticamente subtraídos pelo programa. A localização e identificação de cada gene no arranjo foram definidas em um arquivo texto criado com auxílio do programa CloneTracker 2 (Biodiscovery).

Para ajustar as diferenças sistemáticas na intensidade relativa de cada canal, os dados quantificados foram exportados e transformados pelo software Gene Sight 5.5 (Biodiscovery). A utilização de métodos de suavização de diagramas de dispersão

tornou-se a abordagem mais eficaz na normalização e correção das intensidades pré-análises estatísticas (QUACKENBUSH, 2002). Este processo, definido como normalização, foi aplicado seguindo os parâmetros de correção lowess (“locally weighted linear regression” / “robust locally weighted regression” / “local polynomial regression”) (CLEVELAND, 1979), com um método de normalização local (o algoritmo é aplicado em “subsets” físicos dos dados, isto é um “subgrid”).

Após normalização, os dados das triplicatas dos arranjos, independentes para o mesmo experimento, foram processados pela ferramenta estatística SAM (“Significance Analysis of Microarrays” – CHU et al., 2001) usando Microsoft Excel. Esta análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos (TUSHER et al., 2001). Os genes encontrados nos ensaios realizados foram categorizados através do RhizoBase para determinação do grupo funcional ao qual pertencem.

6. Agrupamento funcional dos resultados obtidos.

Os genes de rizóbios estão distribuídos através de diferentes grupos funcionais, de acordo com suas funções celulares, segundo classificação encontrada no RhizoBase (2006). Para esta classificação foram utilizadas quinze categorias e suas subdivisões (Apêndice). Este esquema de classificação foi empregado para os dados de expressão gerados neste trabalho.

Parte III – Transcriptômica: Análise da expressão gênica de *Bradyrhizobium elkanii* por microarranjo de DNA.

1. Expressão gênica da bactéria cultivada “in vitro” nos meios TY e RDM, ao longo das fases lag, log e estacionária.

O delineamento experimental é descrito na Figura 5.

1.1. Curvas de crescimento de *B. elkanii* em meios RDM, TY e YMB.

Um pré-inóculo foi preparado para a realização das curvas de crescimento. Células de *B. elkanii* cultivadas a 28°C em meio YMA (“Yeast Mannitol Agar”) (VINCENT, 1970), equivalente ao meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928), foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 06 dias após plaqueamento inicial, através da raspagem da massa bacteriana com o auxílio de alça de Drigalsch. A massa bacteriana de 07 placas foi recuperada e diluída em 60 mL de água milli-Ro estéril. A turbidez do pré-inóculo foi registrada através da leitura em um colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson (KLETT MFG).

Dez unidades Kletts do pré-inóculo, correspondentes a $1,5 \times 10^8$ células/mL foram adicionados em frascos especiais “side-arm” contendo 100 mL de TY (BERINGER, 1974), 100 mL de RDM (BISHOP, 1976), ou 100 mL de YML. Os frascos foram mantidos a 28°C sob agitação constante de 160 rpm por um período de 11 dias (262 horas). A concentração de células em cada meio foi determinada a cada 24 horas através do fotocolorímetro com filtro vermelho correspondente a 640 – 700 nm.

O perfil das curvas de crescimento obtidas pela concentração de células foi corroborado pelo número de UFCs em cada fase. Para cada meio, RDM ou TY, foram realizadas triplicatas de cada experimento para o estabelecimento das curvas através da média dos valores obtidos.

1.2. Determinação do número de células e tempo de geração para cultivo em meio RDM e TY.

Para os meios RDM e TY, a partir do pré-inóculo, e a cada 48 hs, amostras de cada meio foram plaqueadas em meio YMA para se proceder à contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Para a contagem de UFC foram retirados 100 µL do caldo de cada meio e adicionados a um eppendorf contendo 900 µL de água estéril. Homogeneizou-se a suspensão através de 05 pipetagens sucessivas, originando uma solução com concentração de diluição 10^{-1} . Em seguida, foram retirados 100 µL da

solução 10^{-1} e misturados com 900 μL de água estéril, seguindo o procedimento descrito anteriormente, originando a diluição 10^{-2} . O processo de diluição foi realizado sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-7} . Alíquotas de 100 μL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram distribuídos em placas de Petri contendo meio YMA. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a inoculação, as placas foram mantidas invertidas em uma B.O.D. a 28°C durante 6 dias, quando se efetuou a contagem das UFCs para o cálculo do número de célula/ml.

Expressões matemáticas foram utilizadas para obtenção do tempo de geração ($g = t/n$), dividindo-se um intervalo de tempo específico ($\Delta T_2 - T_0 = 48 \text{ hs}$) pelo número de gerações (n). O número de gerações foi calculado pela fórmula $n = 3,3(\log_{10}N_2 - \log_{10}N_0)$, onde N corresponde ao número de células calculado.

1.3. Análise da expressão gênica da bactéria cultivada em meio definido RDM e complexo TY.

A idade das culturas para coleta de amostra para obtenção do RNA foi determinada através das curvas de crescimento em cada meio. Os tempos representativos de cada fase, lag, log ou estacionária, foram, respectivamente: T_1 (24 hs), T_2 (48 hs) e T_5 (120 hs) para culturas em meio TY; e T_1 (24hs), T_5 (120hs) e T_8 (192 hs) para culturas em meio RDM.

Destas amostras, foram obtidas as células para extração de RNA e síntese de cDNAs marcados, para hibridização, conforme descrito anteriormente (Parte II, itens 2, 3 e 4). Como referência foram usadas as amostras obtidas em meio RDM. Foram sintetizados cDNAs marcados fluorescentemente com Cy3, para a referência, e marcados com Cy5 para os testes, amostras em TY. O resultado dos níveis de expressão gênica diferencial foi dado como “log r ” (na base 2), sendo que “ r ” corresponde à razão Cy5/Cy3.

Para estudar com mais detalhes os perfis de expressão ao longo das fases lag, log e estacionária em meio RDM, foi abordado adicionalmente a técnica de RNA de referência comum (STERRENBURG et al., 2002; NOVORADOVSKAYA et al., 2004).

Comparações de níveis de expressão entre diferentes experimentos de microarranjo tornam-se mais práticos quando uma referência (Cy3) comum é co-hibridizada com cada microarranjo individualmente (Figura 6). A extração de RNA e síntese de cDNAs marcados, para hibridização, segue conforme descrito anteriormente (Parte II, itens 2, 3 e 4).

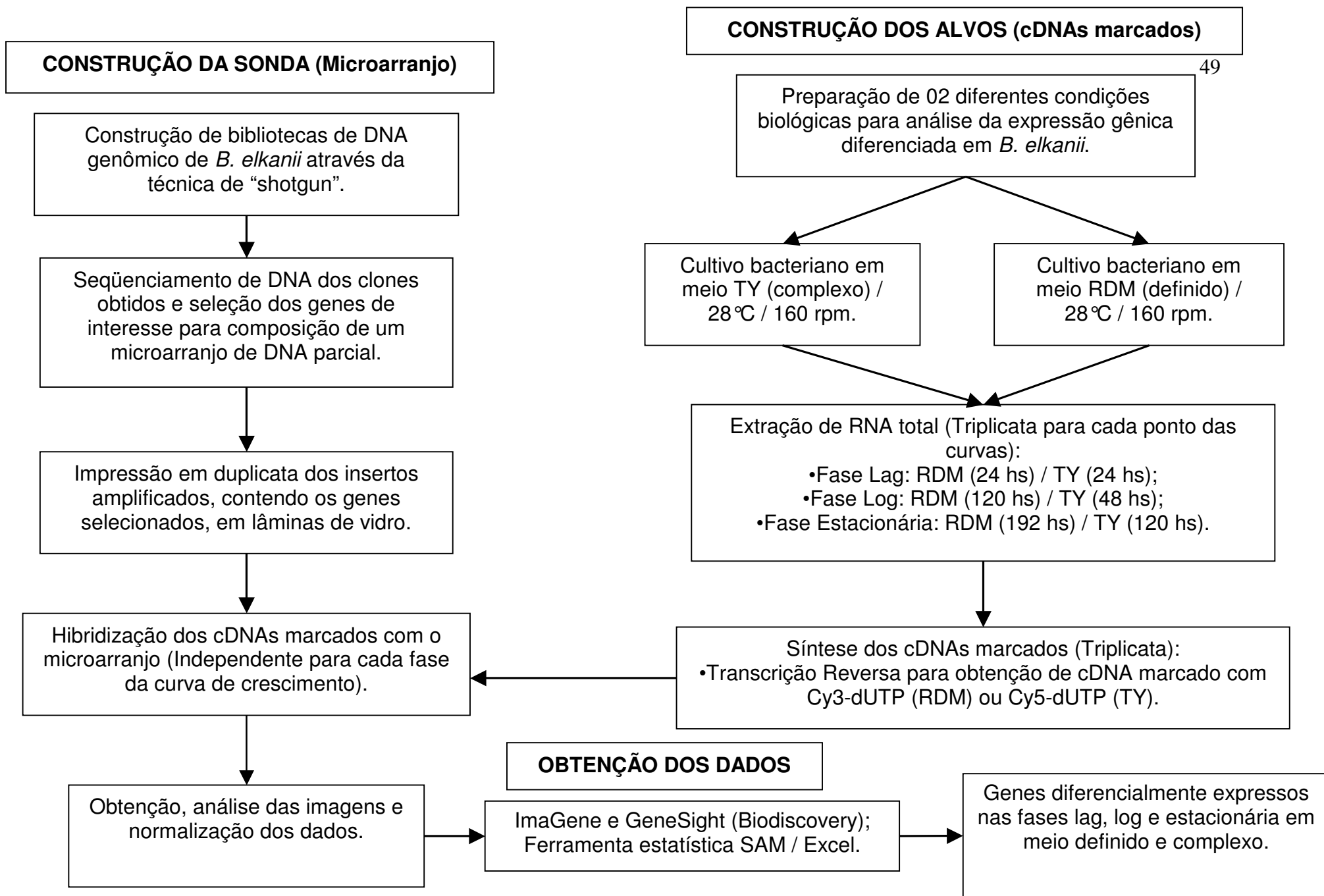


Figura 5: Delineamento experimental para abordagem dos genes diferencialmente expressos em meio RDM e TY.

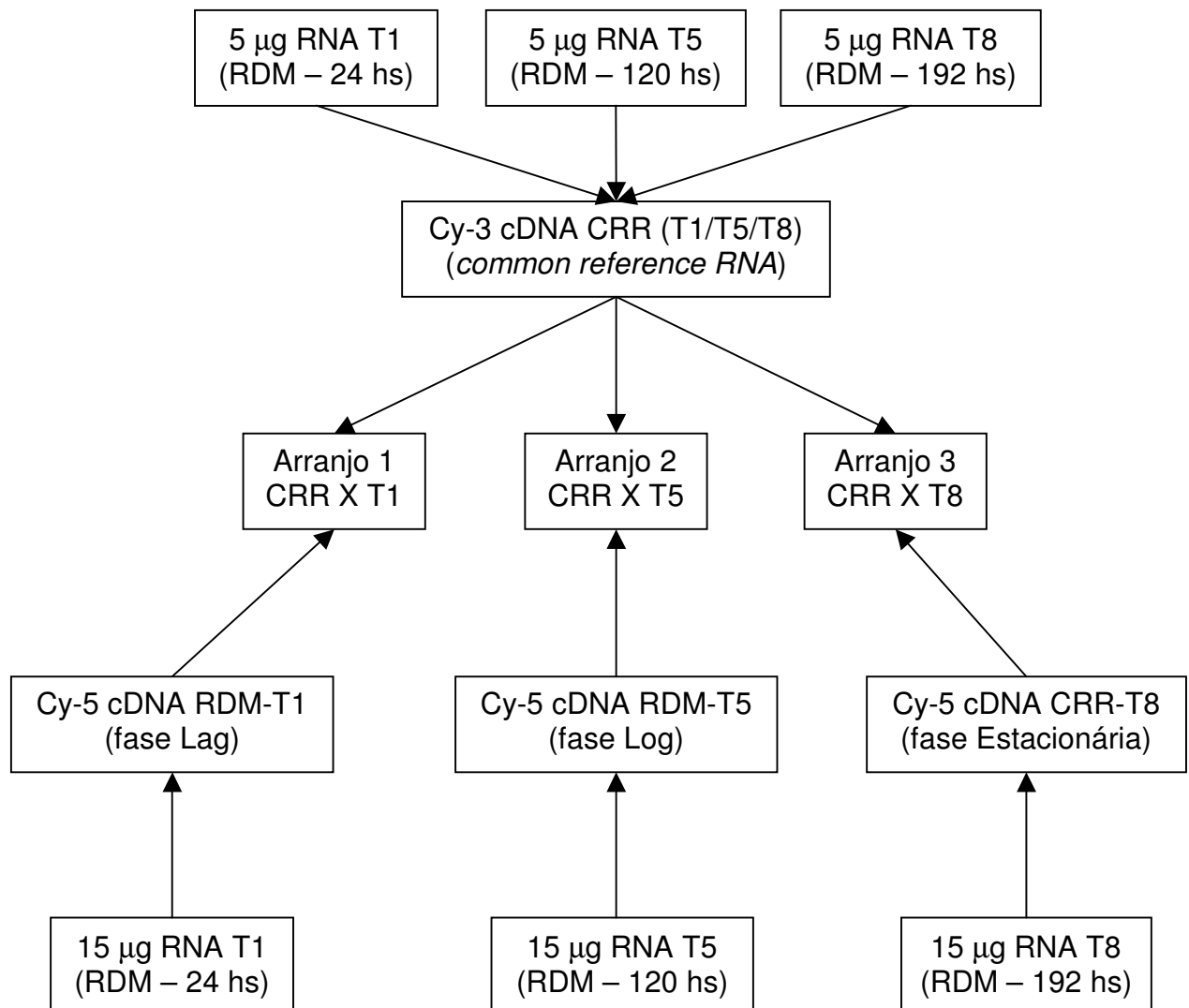


Figura 6: Delineamento experimental para obtenção de cDNAs alvos para microarranjo de DNA, utilizando RNA comum de referência.

2. Expressão gênica do microssimbionte avaliada nos dias 13, 28 e 48 após inoculação em plantas de soja (*G. max*).

O delineamento experimental é descrito na Figura 7.

2.1. Nodulação de plantas de soja inoculadas com *B. elkanii* SEMIA 587.

Sementes de soja, cultivar M-SOY 7901, foram desinfectadas 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 a sete vezes por 1 minuto cada, as sementes foram embebidas em uma suspensão bacteriana contendo células de *B. elkanii* crescidas em meio YMB (“Yeast Mannitol Broth”) (VINCENT, 1970) durante 72 horas a 28°C sob agitação de 160 rpm. As sementes permaneceram incubadas nesta suspensão por cerca de 10 minutos, quando foram então semeadas em vasos plásticos tubetes de 300 mL, contendo vermiculita esterilizada como substrato de plantio. As plantas foram reinoculadas sete dias após o plantio, adicionando-se 1 mL de suspensão bacteriana conforme descrita próximo ao colo das plantas. Quando necessário, foi fornecida solução nutritiva isenta de nitrogênio (GIBSON, 1987). Cada experimento foi conduzido por períodos de até 8 semanas, no fim das quais a nodulação foi avaliada nos tempos 07, 13, 28, 40, 48 e 56 dias após inoculação. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunhas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, entre os meses de janeiro e março.

2.2. Análise da expressão gênica em *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, “in vitro” e em simbiose.

Uma cultura de células de *B. elkanii* 587 em meio YMB, após 72 hs de cultivo a 28°C, 160 rpm, foi utilizada para inoculação de raízes de soja, conforme descrito anteriormente (2.1.). Células simbiontes de bacterióides foram isoladas a partir dos nódulos jovens e maduros, obtidos em três diferentes estágios do processo de

nodulação e fixação biológica do N_2 . Estas fases correspondem aos períodos: 1) 13 d.a.i. (dias após inoculação); 2) 28 d.a.i.; e 3) 48 d.a.i.. O isolamento de bacterióides dos nódulos foi efetuado conforme metodologia descrita por CHOCHAN & 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. A extração de RNA e síntese de cDNAs marcados, para hibridização, foi efetuada conforme descrito anteriormente (Parte II, itens 2 e 3). Células de vida livre, obtidas de cultura em fase logarítmica em YMB (72 hs/28 °C/160 rpm), correspondendo ao estado das células no momento da inoculação, foram usadas como referência. Foram sintetizados cDNAs marcados fluorescentemente com Cy3, para a referência, e marcados com Cy5 para os testes, diferentes períodos de simbiose. O resultado dos níveis de expressão gênica diferencial foi dado como “log r” (na base 2), sendo que “r” corresponde à razão Cy5/Cy3.

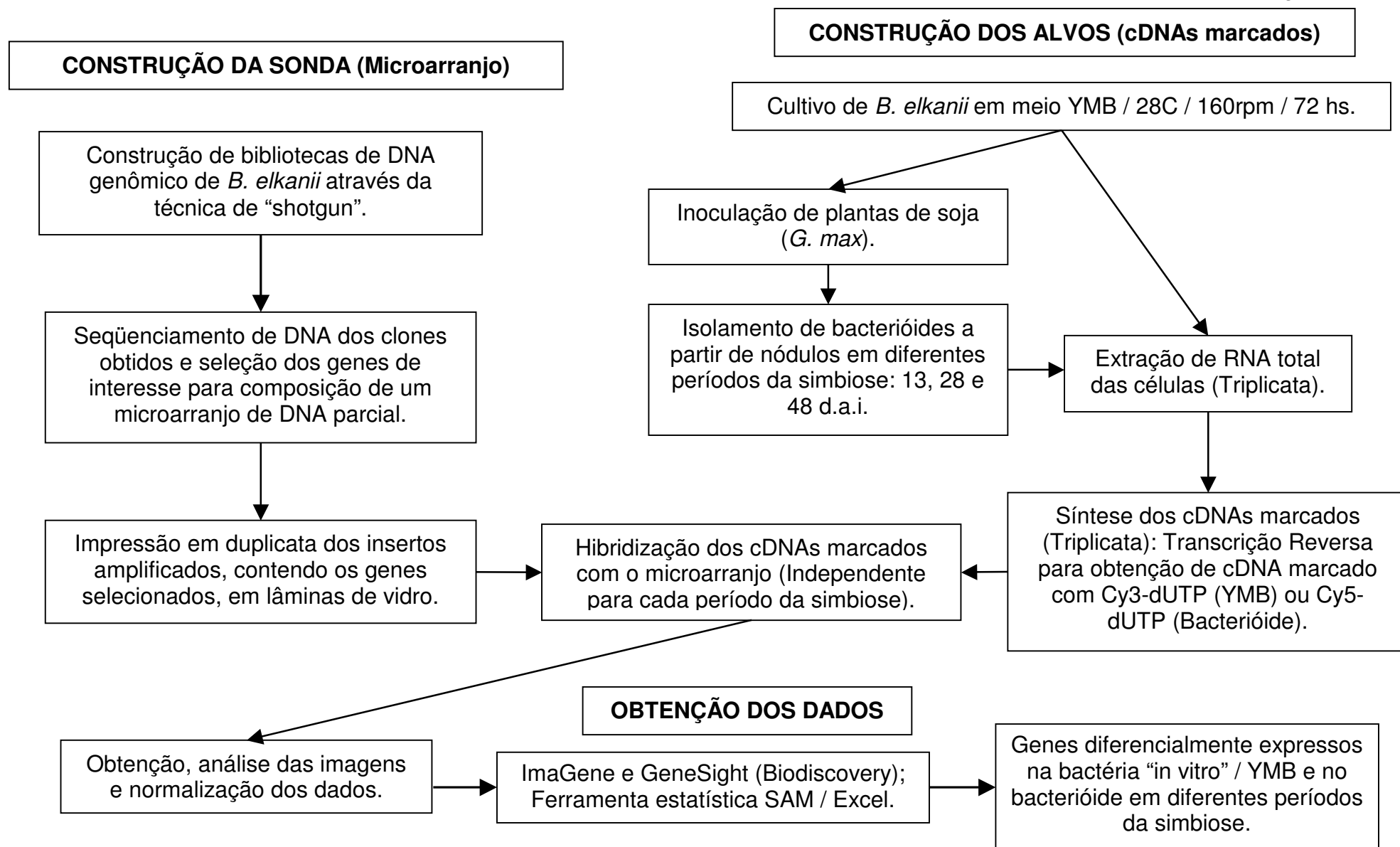


Figura 7: Delineamento experimental para abordagem dos genes diferencialmente expressos em bacterióide e meio YMB.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Parte I – Genômica: Construção das bibliotecas plasmideais Be587, seqüenciamento e seleção de genes para composição do microarranjo de DNA.

O seqüenciamento genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 teve início no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) a partir de 2002 (PRADO, 2004), quando foram contabilizados 9024 clones de bibliotecas de “shotgun”. Atualmente, com o presente trabalho, as bibliotecas de “shotgun” Be587 foram ampliadas em 9471 clones, atingindo um montante de 18495 clones. Estas bibliotecas foram geradas nos seguintes plasmídeos: pUC18/*Bam*HI, pUC18/*Sma*I, pUC19/*Sma*I e pCR[®]4Blunt-TOPO. O DNA de alguns clones das diferentes bibliotecas de DNA genômico Be587 pode ser visualizado na Figura 8. O padrão de bandeamento em diferentes alturas, nos diferentes clones, sugere a entrada do inserto no plasmídeo, bem como sua manutenção no hospedeiro, *E. coli* DH5 α . A partir destes clones, foram amplificados os fragmentos de DNA (Figura 9) que compõem o micorarranjo de DNA Be587. A maioria das amostras amplificadas apresentou apenas uma banda, indicativo da presença de apenas um fragmento correspondente ao inserto do DNA plasmideal.

A partir do seqüenciamento de DNA destes clones foram obtidas 16016 seqüências com tamanho de fragmentos entre 0,6 a 1,6 Kb. Destas, 4265 foram excluídas por apresentarem problemas e 11751 foram utilizadas para montagem do genoma Be587. Dentre as seqüências selecionadas, 10176 apresentaram mais de 400 bases com qualidade média phred ≥ 20 , correspondendo a um percentual maior que 86%. A montagem genômica produziu 2522 “contigs” compostos por 8043 seqüências. Quando comparado aos 8317 genes de *B. japonicum* (KANEKO et al., 2002), a média de 3250 genes identificados em *B. elkanii* SEMIA 587 correspondem a 39% de genes

identificados em *B. japonicum* USDA 110. A ferramenta “OC Identifier” selecionou clones contendo ORF única e clones contendo ORFs diferentes para cada sequência. Esses clones selecionados foram usados para compor o microarranjo de DNA Be587. Esta abordagem de seleção de clones foi utilizada para composição do microarranjo de DNA Be587, contendo 2654 genes (CANTÃO et al., 2006). Para composição do microarranjo de DNA Be587 parcial, até o momento, foram utilizados clones de bibliotecas formadas apenas em vetor plasmídeo pUC18/*Sma*I.

Alguns dos genes presentes na lâmina gerada de microarranjo de DNA de *Bradyrhizobium elkanii* são apresentados na Tabela 02. A presença de genes relacionados às categorias dos variados grupos funcionais, incluindo genes para nodulação e fixação do nitrogênio, permite explorar este microarranjo para ensaios diversificados. Desta forma, com a representação de diferentes funções biológicas, foi possível investigar genes diferencialmente expressos na bactéria “in vitro” e em simbiose.

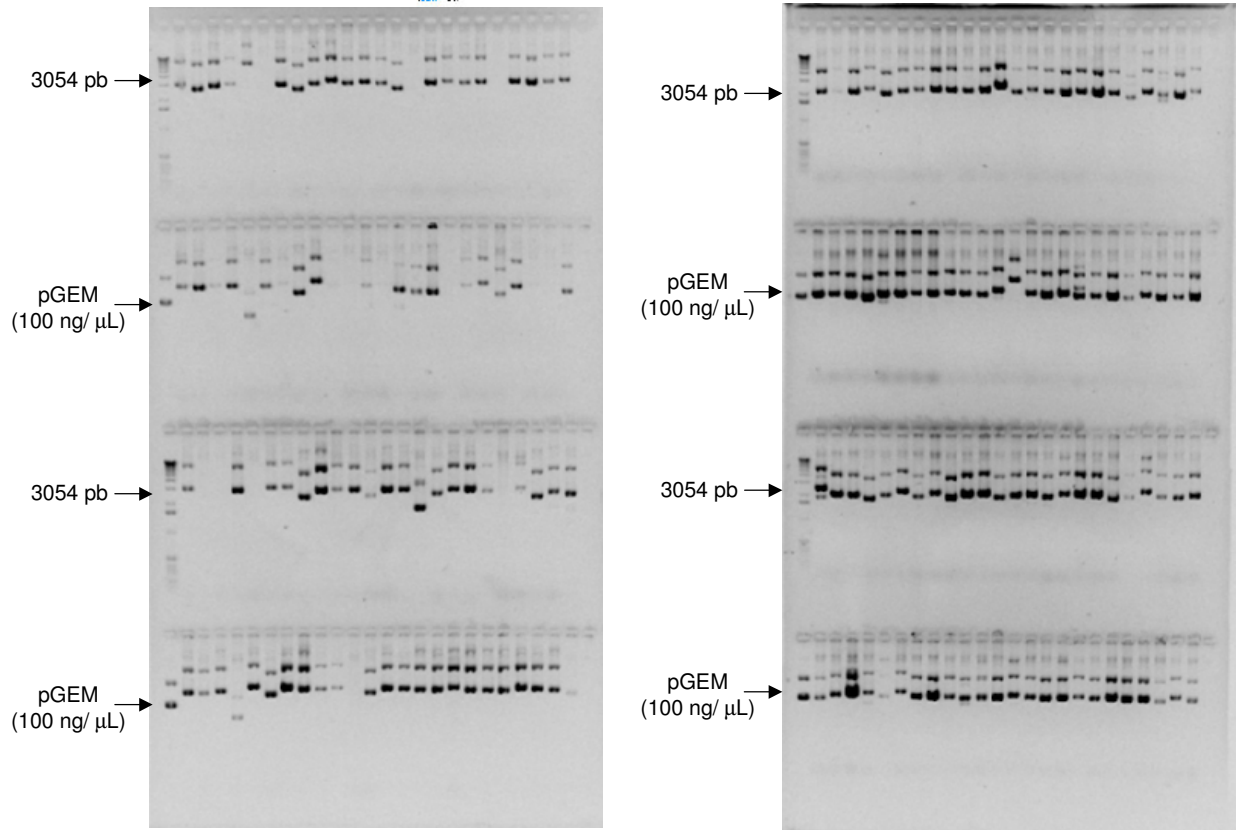


Figura 8: Eletroforograma em gel de agarose 0,8% de amostras de DNA dos clones de algumas bibliotecas de “shotgun”, em diferentes vetores, para *B. elkanii* SEMIA 587. pUC18/19 (Fermentas), pCR® 4Blunt-TOPO (Invitrogen).

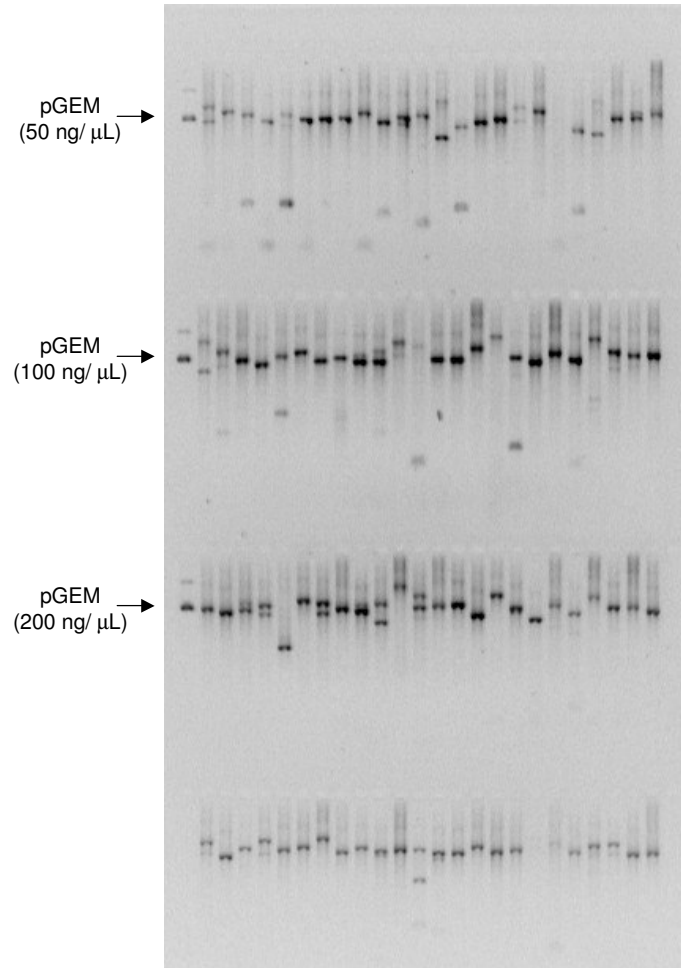


Figura 9: Eletroforograma em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados por PCR, a partir de amostras de DNA dos clones de *B. elkanii* SEMIA 587, selecionados para composição do microarranjo de DNA.

Tabela 2: Exemplo de alguns clones selecionados da biblioteca Be587, contendo genes que compõem a lâmina do microarranjo Be587.

(<http://lbmp.fcav.unesp.br/be587/index.htm>)

Clone	ID	Score	Evalue	Gene/Produto gênico
BE5870101G05	1974	341	1e-122	acetyl-CoA acetyltransferase
BE5870108A08	2564	117	1e-24	Aminotransferase
BE5870118D06	2053	711	0.0	C4-dicarboxylate transport protein
BE5870151G03	2207	271	1e-71	Catalase
BE5870121F08	2127	436	1e-120	cobT protein
BE5870114A08	3044	453	1e-126	Disrupted noeE
BE5870166B05	39	109	1e-23	FixI
BE5870134F10	687	139	1e-31	Glucokinase
BE5870132B07	1934	598	1e-169	hydrogenase maturation protein
BE5870135A01	1565	191	1e-47	Nitrogen fixation transcriptional regulator fixK2, Crp/Fnr family
BE5870119B08	1614	423	1e-117	NodA protein
BE5870142E01	2998	593	1e-167	NoDI
BE5870142E01	2999	600	1e-170	NodDII
BE5870119B08	1613	199	1e-49	NodK
BE5870114A08	2071	382	1e-106	NodP
BE5870114A08	2070	231	1e-59	NodQ
BE5870116F11	1286	145	1e-33	NodU
BE5870181F02	991	293	1e-78	NodN
BE5870181F08	3140	76	1e-12	NolO
BE5870130D11	3066	178	1e-43	NolY
BE5870119D05	722	295	1e-78	NwsA
BE5870126G11	1123	189	1e-47	ornithine aminotransferase
BE5870136D02	3142	442	1e-140	probable fucosyl transferase protein, NodZ
BE5870134B11	2526	563	1e-159	probable manganese transport protein; MntH1
BE5870128H11	661	404	1e-111	probable trehalose-6-phosphate synthase
BE5870135E04	992	173	1e-31	Putative flagellin
BE5870124E06	2471	738	0.0	Putative glucosamine synthase
BE5870126A07	1413	801	0.0	Putative iron transport protein
BE5870110D11	3061	126	1e-48	replicative DNA helicase (dnaB)
BE5870147H12	3129	792	0.0	RNA polymerase sigma-54 subunit
BE5870146G06	2741	795	0.0	transcription termination factor
BE5870167H07	792	70	1e-11	two-component, nitrogen fixation sensor protein fixL

Parte II – Transcriptoma: Comportamento metabólico de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 em meios complexo (TY) e definido (RDM), avaliado por microarranjo de DNA.

1. Cultivo de *B. elkanii* em meio complexo e definido.

Os tempos de geração são fortemente influenciados pela composição nutricional do meio, como pelas condições físicas de incubação. As estirpes do gênero *Bradyrhizobium* são de crescimento lento e produzem metabólitos alcalinos no meio de cultura (URENHA et al., 1994; MATOS-CUZCANO et al., 1998). O meio complexo TY continha triptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, carbono e energia. O meio definido RDM continha glicerol, como única fonte de carbono e energia, e glutamato de Na⁺² como fonte de nitrogênio. Além das diferenças metabólicas, foram observadas taxas de crescimento bastante diferentes da estirpe em cada meio (Figura 10). Em meio RDM, as células de *B. elkanii* apresentaram um crescimento quase 4 vezes mais lento, com G = 68,2 hs, quando comparado com o crescimento em meio TY, G = 17,2 hs.

A taxa de crescimento para o meio YMB (Figura 10) mostra-se intermediária entre a observada para os meios RDM e TY. Células cultivadas em meio YMB foram utilizadas para inoculação de plantas de soja, uma vez que sua composição não prejudica o processo de nodulação.

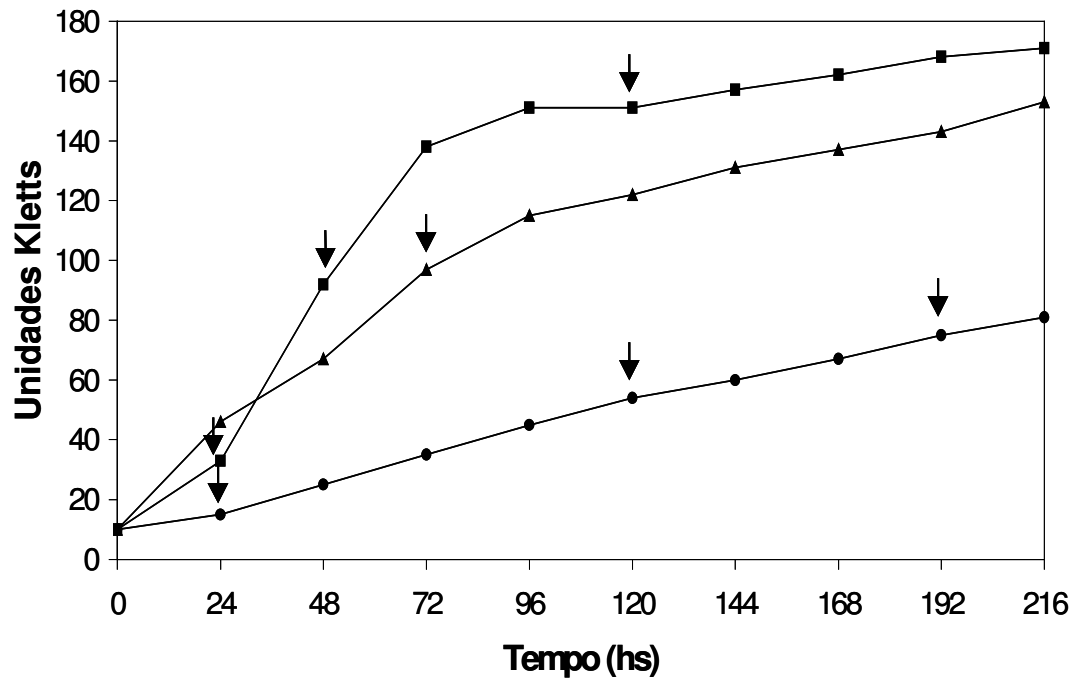


Figura 10: Cultivo de *B. elkanii* SEMIA 587 em meio RDM (•), meio TY (■) e meio YMB (▲), durante dez dias. As setas indicam os pontos de coleta de células para extração de RNA, os quais correspondem aos períodos dentro das fases lag, log e estacionária.

2. Perfil de qualidade do RNA total bacteriano em relação à curva de crescimento.

Uma vez que RNAs íntegros são requeridos para a obtenção de cDNAs eficientes para hibridização, o perfil de qualidade (Figura 11) e rendimento do RNA (Tabela 3) de *B. elkanii* foi verificado ao longo de seu cultivo em meio RDM e TY. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm estima o grau de pureza do RNA. Esta relação é influenciada pelo pH e concentração de sais da solução na qual o RNA foi diluído. RNAs diluídos em água mantêm uma relação na faixa entre 1,5 e 1,9, enquanto RNAs diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, mantêm a relação entre 1,8 e 2,1. Por sua vez, o perfil eletroforético do RNA total íntegro, em gel de agarose, dever mostrar um bandejamento dos RNAs ribossomais 23S e 16S correspondente aos tamanhos 2,9 e 1,5 Kb, respectivamente (SAMBROOK et al., 1989).

À medida que as células alcançam a fase estacionária, a qualidade do RNA parece diminuir (Figura 11), o mesmo acontecendo com seu rendimento (Tabela 3). Isto não é surpreendente, uma vez que esta fase precede a fase de morte celular. A fase estacionária é caracterizada pelo acúmulo de metabólicos tóxicos e exaustão de nutrientes, enquanto o número de células viáveis diminui. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção, sendo obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular (FROBISHER et al., 1978).

A taxa de crescimento de células bacterianas aumenta em proporção à qualidade do meio de cultivo, embora não necessariamente em proporção de sua composição exata. Este aumento na taxa de crescimento é acompanhado por um aumento no número de ribossomos e nas concentrações de fatores auxiliares da tradução. As bactérias que respondem ao cultivo com um crescimento mais rápido contêm proporcionalmente mais RNAs estáveis (RNAs ribossomais e transportadores). A razão para esta melhor estabilidade do RNA consiste no fato de que para crescer mais rápido, as bactérias devem sintetizar proteínas mais rapidamente (BREMER & DENIS, 1996).

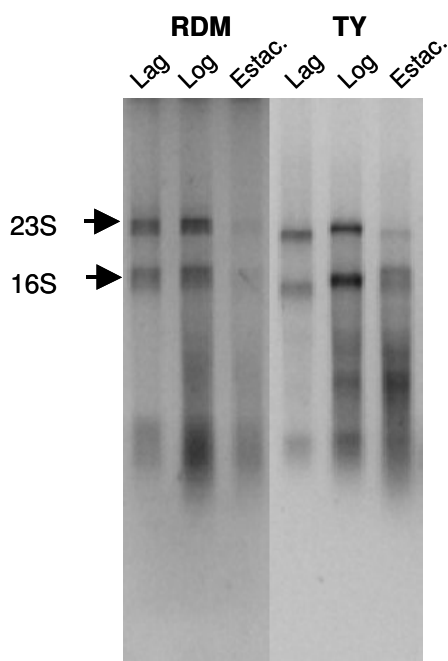


Figura 11: Perfil de qualidade do RNA total de *B. elkanii* SEMIA 587 cultivada em meio RDM e TY, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante.

Tabela 3: Rendimento médio de RNA total obtido de células de *B. elkanii* SEMIA 587, ao longo das fases das curvas de crescimento em meios RDM e TY. RDM = 100 ml de cultura, TY = 50 ml de cultura.

Amostra	Relação 260/280 nm	Rendimento (µg)
RDM Lag	1,93	7,25
RDM Log	1,86	33,15
RDM Estac.	1,90	20,2
TY Lag	1,97	21,7
TY Log	1,89	53,05
TY Estac.	1,93	39,25

3. Hibridização, análise das imagens de microarranjo de DNA e parâmetros de expressão gênica.

As imagens observadas na Figura 12 apresentam uma lâmina do microarranjo de DNA Be587 escaneada, contendo DNA sonda dos genes selecionados que a compõem, e os resultados da hibridização com os alvos de cDNA marcado fluorescentemente. O aspecto geral destas imagens ilustra o procedimento para os diferentes ensaios realizados, uma vez que as imagens adquiridas na forma de “false color” são muito semelhantes. A Figura 12A corresponde à lâmina do microarranjo anterior ao processo de hibridização, contendo apenas os produtos amplificados por PCR e os controles impressos. As Figuras 12B e 12C apresentam imagens do micorarranjo hibridizado, escaneadas nos comprimentos de onda dos canais verde (Cy3) e vermelho (Cy5), respectivamente. A intensidade dos “spots” observados indica a eficiência da hibridização da sonda contida no microarranjo com os alvos de cDNA marcados fluorescentemente.

A imagem sobreposta (Figura 12D) foi obtida através da composição realizada pelo programa ImaGene (Biodiscovery). Ressalta-se que a coloração das imagens são falsas, uma vez que o sinal emitido pela fluorescência é decodificado pelo programa de análise e interpretado de forma matemática. Contudo, a sobreposição dos canais produz uma imagem que permite uma rápida visualização qualitativa de um experimento de microarranjo de DNA, revelando informações sobre o balanço de cores, uniformidade da hibridização, uniformidade dos “spots”, “background” e artefatos que possam ocorrer no experimento. Também é possível se ter uma impressão grosseira do número de genes que são diferencialmente expressos entre as duas amostras, uma vez que a coloração dos “spots” (verde, vermelho ou amarelo) indica em qual condição, ou em ambas, um gene teve expressão mais elevada (Figura 12).

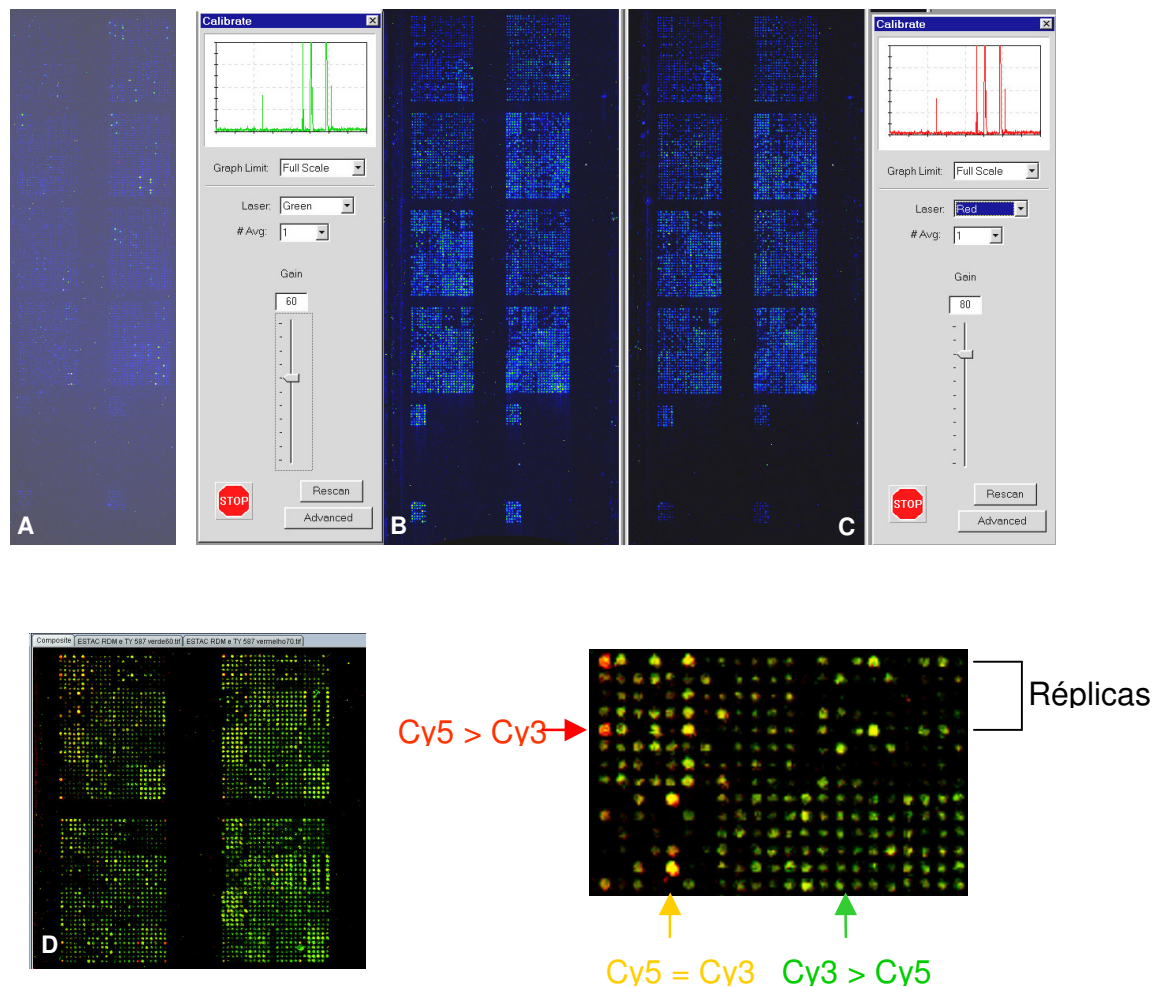


Figura 12: Imagens “false color” dos “spots” que compõem o microarranjo de DNA Be587, impresso em lâmina de vidro. (A) DNA sonda sem hibridização; (B) DNA sonda hibridizado escaneado no canal verde (532 nm/Cy3); (C) DNA sonda hibridizado escaneado no canal vermelho (635 nm/Cy5); (D) Imagem de uma composição obtida através da sobreposição das leituras verde/vermelho, realizada pelo programa ImaGene. O detalhe mostra as relações entre os sinais para Cy3 e Cy5.

Após a quantificação dos sinais hibridizados, procede-se a normalização dos dados. Esta técnica matemática minimiza as discrepâncias dos dados de diferentes experimentos devido a variáveis não biológicas tais como preparação de amostras, condições de hibridização, marcação, quantidade de sonda, entre outros. As intensidades da fluorescência vermelha (Cy5) são freqüentemente inferiores às intensidades verdes (Cy3), devido a uma incorporação relativamente menor dos nucleotídeos Cy5. Assim, dado o desbalanceamento entre as intensidades vermelha e verde, causado por fatores não inerentes a resposta biológica, a normalização pode ser definida como um nivelamento matemático dos dados (YANG et al., 2002).

Os valores de expressão gênica são determinados como taxas de expressão de uma condição experimental, ou teste, sobre outra condição referência, ou controle. Os valores são obtidos pela fórmula “log r” (na base 2), sendo que “r” corresponde à razão Cy5/Cy3. Assim os valores são positivos para o numerador (Cy5), representativos da condição teste ou experimental (meio TY), e negativos para o denominador (Cy3), representativos da condição controle ou de referência (meio RDM). É importante ressaltar que os valores positivos e negativos não indicam genes induzidos ou reprimidos, mas, sim, genes diferencialmente expressos em cada condição (Figura 13). As taxas mostram o quanto a expressão de um determinado gene é superior em uma condição em relação à outra. Assim, a escolha da condição de referência tem implicações diretas sobre os resultados obtidos, uma vez que a taxa de expressão de determinado gene depende de sua expressão em ambas as condições (CHEN et al., 1997).

A significância dos genes diferencialmente expressos foi calculada pela ferramenta estatística SAM (“Significance Analysis of Microarrays”). Esta ferramenta utiliza permutações das medidas repetidas dos dados, triplicatas, para estimar a porcentagem de genes identificados. A interface gráfica que representa os genes diferencialmente expressos para os meios RDM e TY, nas fases lag, log e estacionária, é mostrada na figura 14. Com base em um “fold change” definido como 1,5, fator limitante da taxa de expressão, um valor $\log_2 r \geq 0,58$ foi considerado como indicador significativo da expressão de genes para *B. elkanii*, cultivada em meio RDM e TY

(Tabela 4). Análises para o meio RDM permitiram detectar 37, 68 e nenhum gene para as fases lag, log e estacionária, respectivamente. Para o meio TY, foram detectados 24, 23 e 60 genes para as fases lag, log e estacionária, respectivamente.

Os parâmetros técnicos da análise SAM, mostrados na Tabela 4, demonstram que os dados obtidos são confiáveis estatisticamente. O valor correspondente ao “q-value” corresponde a menor taxa de genes falsamente detectados. Ele corresponde ao “p-value”, mais familiar, porém é adaptado à análise de um grande número de genes, mostrando a significância dos genes na análise (TUSHER et al., 2001).

As funções dos genes analisados foram atribuídas por homologia com proteínas cujas seqüências encontram-se em bancos de dados. Os dados apresentados refletem as taxas de expressão dos níveis relativos dos transcritos de genes individuais, não fornecendo indicações dos mecanismos de regulação ou da presença do produto final, proteína expressa. A tendência geral dos resultados mostrou-se clara e contundente, embora a análise evoque a subjetividade do pesquisador ao avaliar se a significância estatística corresponde à biológica. Portanto, deve ser considerado que para se estudar a regulação gênica dos transcritos, verificações individuais e funcionais devem ser levadas em conta.

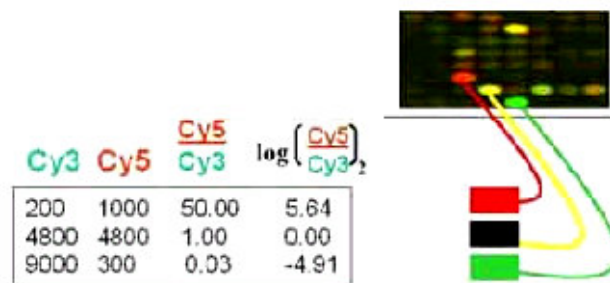


Figura 13: Esquema ilustrativo da representação das taxas de expressão gênica e seu significado para dados normalizados. Valores positivos (Cy5) indicam genes diferencialmente expressos na condição teste, enquanto, valores negativos (Cy3) indicam genes para a condição referência. Quando o valor da razão é igual a 1, o gene se expressa com a mesma intensidade em ambas as condições (<http://research.nhgri.nih.gov/microarray/>).

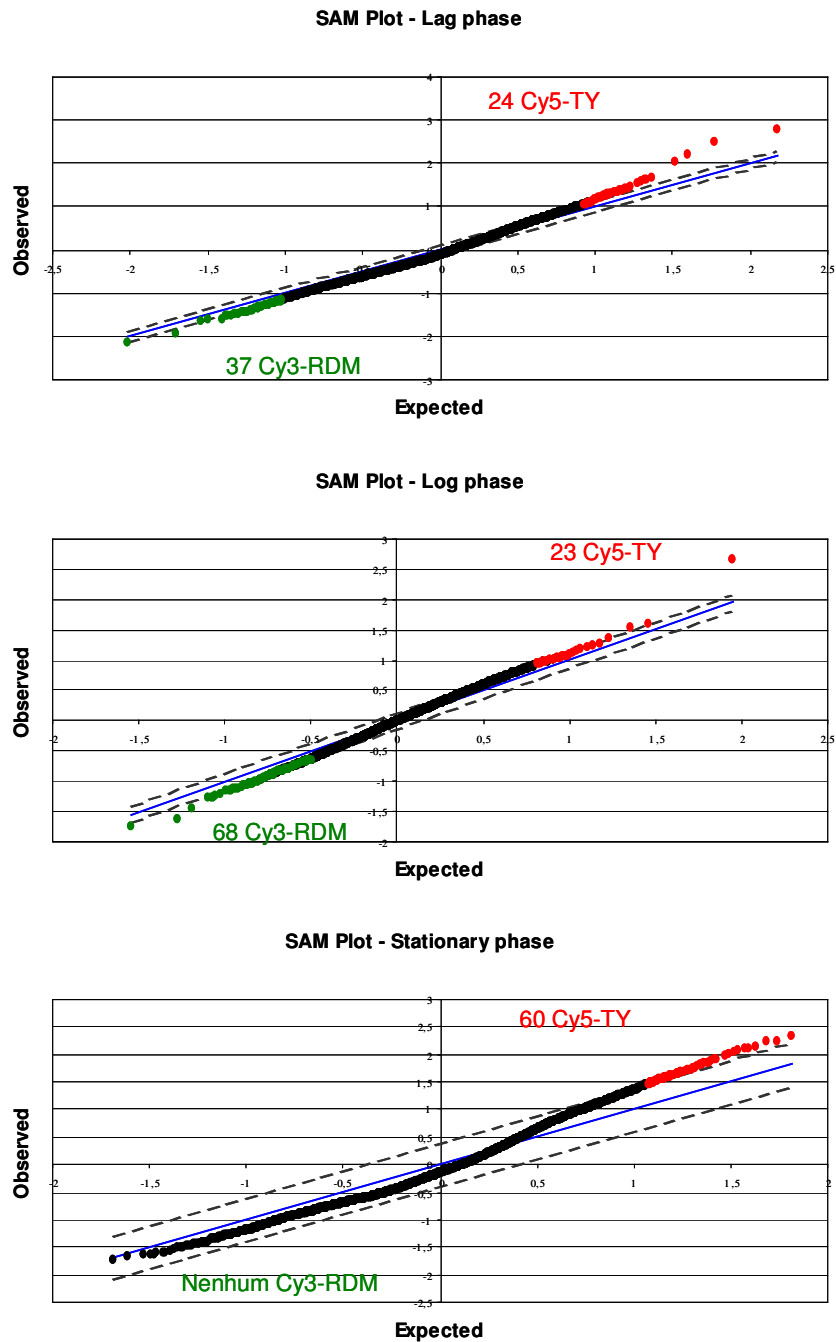


Figura 14: Identificação e distribuição dos genes diferencialmente expressos, utilizando a ferramenta SAM, em verde para o meio RDM e em vermelho para o meio TY. Os gráficos representam a diferença relativa observada $dO(i)$ versus à diferença relativa esperada $dE(i)$, dos genes diferencialmente expressos. A linha contínua, em azul, indica quando o $d(i) = dE(i)$. As linhas pontilhadas são referentes à distância Δ da linha contínua.

Tabela 4: Parâmetros aplicados pela ferramenta SAM, durante análise dos dados, e número de genes diferencialmente expressos para *B. elkanii* SEMIA 587 cultivada em meio RDM e TY.

Condição	Parâmetros de análise		Parâmetros computados					
	<i>Fold Change</i>	Δ <i>Value</i>	<i>FSN (False Significant Number)</i>	<i>FDR (False Discovery Rate)</i>	<i>q-value (%)</i>	Confiabilidade dos dados	# Genes significantes	# Genes diferencialmente expressos
Fase Lag	1,5	0,13	0,87	1,06	0,2879	99,71%	61	24 Cy5 - TY
								37 Cy3 - RDM
Fase Log	1,5	0,13	0,78	0,68	0,3588	99,64%	91	23 Cy5 - TY
								68 Cy3 - RDM
Fase estacionária	1,5	0,40	0,65	0,97	0,1284	99,87%	60	60 Cy5 - TY
								Nenhum Cy3 – RDM

4. Padrões de expressão gênica de *B. elkanii*, quando cultivada em meios RDM e TY.

O nível e estabilidade dos transcritos primários mudam na proporção da taxa de crescimento afetando a expressão gênica ao nível da maquinaria de transcrição e síntese de proteínas. Concomitantemente, alterações na composição celular bacteriana estão associadas à taxa de crescimento (KEENER & NOMURA, 1996).

Os padrões de expressão gênica de *B. elkanii* cultivada em meio definido (RDM) ou complexo (TY) foram determinados (Tabela 5 e Figura 15). Foram encontrados genes para todas as categorias de grupos funcionais, exceto Transcrição. A categoria Proteínas de transporte e ligação teve destaque em todas as fases de crescimento em ambos os meios. As células de *B. elkanii* inoculadas em ambas as condições partiram do mesmo pré-inóculo, obtido a partir do cultivo em placas com meio YMA. Em termos de qualidade nutricional, o meio YMA apresenta composição intermediária entre o RDM

e o TY, constituído de extrato de levedura como principal fonte de carbono, nitrogênio e energia, além de manitol. O meio RDM possuía glicerol e glutamato de sódio, enquanto o meio TY continha extrato de levedura e triptona, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Portanto, no período inicial de adaptação ao meio, fase lag, as células em ambas as condições de cultivo apresentavam-se no mesmo estado metabólico. Assim, dada à qualidade nutricional mais limitada em meio definido RDM, as células apresentaram maior número de genes para sua adaptação, quando comparado ao meio TY, na fase lag. Isto pode ter sido causado por um maior estresse gerado em meio RDM nesta fase inicial. Também, um maior número de categorias de grupos funcionais foi representado em meio RDM, com destaque para as categorias Metabolismo intermediário central, Metabolismo energético e Metabolismo de Ácidos graxos, fosfolípídeos e esterol. Em TY, fase lag, também se destacaram as categorias Processos celulares e Funções regulatórias (Figura 15).

Durante a fase lag, a categoria Replicação, recombinação e reparo do DNA foi representada de forma eqüitativa em ambos os meios. Contudo, durante a fase log, uma aparente discrepância ocorre pela expressão de um maior número de genes diferenciais, para esta categoria, em meio RDM e não em meio TY, onde a divisão celular é mais rápida. Adicionalmente, as categorias Metabolismo intermediário central, Metabolismo energético, Metabolismo de Ácidos graxos, fosfolípídeos e esterol e Funções regulatórias também se destacaram em RDM, oferecendo suporte para a divisão celular nesta fase (Figura 15).

Particularmente, a categoria Replicação, recombinação e reparo do DNA não teve sua expressão diferencial encontrada em TY, durante a fase log. Possivelmente, a maquinaria celular bioquímica para esta função já se encontrava expressa anteriormente ao período de coleta de células para análise em TY. Isto pode ser corroborado pelo maior número de genes para as categorias de Metabolismo de ácidos graxos, fosfolípídeos e esterol (Figura 15). Contudo, comparativamente com RDM, não se pode descartar a hipótese de que os genes para replicação do DNA tenham sido

induzidos no meio definido pelo fato das células sofrerem um choque, causado pela limitação de nutrientes.

Durante a fase log, encontra-se o maior número de genes significativos para meio RDM (Tabela 5), justamente a fase em que as células apresentam a maior atividade metabólica. A obtenção de energia a partir de uma fonte limitada em carboidratos, somada à necessidade de biossíntese de membrana celular para as células em divisão, pode ter causado uma maior taxa de expressão para as categorias que envolvem divisão celular e biossíntese de macromoléculas. Durante a mesma fase, em TY, as células podem aparentemente estar apresentando um estado metabólico mais estável, mantendo taxas elevadas para genes utilizados na biossíntese de membranas e elevando a taxa de genes para biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e esterol (Figura 15).

Nenhum gene diferencialmente expresso foi encontrado durante a fase estacionária para RDM. Este resultado foi confrontado com o maior número de genes observados para células cultivadas em meio TY (Tabela 5). Enquanto em meio RDM as células podem encontrar-se em um estado metabólico mais estável, em meio TY as células podem ter sido submetidas a um maior estresse, causado pelo crescimento mais rápido, esgotando os recursos disponíveis. Dada a importância desta fase de cultivo na obtenção de células para produção de inoculantes comerciais, este resultado nos levou a analisar detalhadamente o cultivo de *B. elkanii* em meio RDM, aplicando-se mistura de RNA de referência comum (CRR), ou universal (CHURCHILL, 2002), nos microarranjos de DNA. Assim, os dados referentes à fase estacionária em meio RDM foram obtidos por análises independentes (Figura 16).

Com estas análises (CRR), foram identificados 33, 29 e 8 genes diferencialmente expressos nas fases lag, log e estacionária, respectivamente, para RDM. As taxas de expressão na fase lag apresentaram semelhança com àquela observada anteriormente em TY, destacando-se as categorias Metabolismo energético e Funções regulatórias. A categoria Proteínas de transporte e ligação foi altamente representada nas fases lag e estacionária. A categoria de Replicação, recombinação e reparo do DNA, que não foi representada na fase lag/CRR, destacou-se agora na fase log, sendo mais contundente

com esta fase dinâmica de crescimento. O metabolismo energético manteve-se com taxas elevadas na fase log (Figura 16).

Finalmente, a fase estacionária, embora representada por um baixo número de genes, apresentou as categorias Biossíntese de aminoácidos, Metabolismo intermediário central, Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol, Tradução e Proteínas de transporte e ligação (Figura 16). A representação desta última, categoria, demonstrou o estado estável das células em RDM, conforme sugerido anteriormente, indicando a troca de metabólitos entre as células e o meio. Provavelmente, nesta condição, as células estejam preparando sua maquinaria bioquímica para uso de reservas metabólicas e síntese de exopolissacarídeos (EPS), material gomoso que envolve as células e as protege de dessecação e estresses ambientais, além de auxiliar na assimilação de nutrientes (SUTHERLAND, 1998).

A taxa de genes enquadrados na categoria Hipotéticos, não apresentando homologia com nenhum gene de função conhecida, foi elevada em todas as condições (Figuras 15 e 16).

Tabela 5: Número de genes por grupos funcionais em meio RDM e TY.

Categoria	RDM			TY		
	Lag	Log	Estac.	Lag	Log	Estac.
Biossíntese de aminoácidos	1	2	-	1	1	1
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	1	1	-	0	4	3
Envelope celular	1	0	-	0	0	1
Processos celulares	1	0	-	3	1	3
Metabolismo intermediário central	3	5	-	1	1	2
Metabolismo energético	3	5	-	2	0	5
Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol	3	5	-	2	2	3
Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos	2	1	-	0	1	3
Funções regulatórias	2	5	-	3	2	7
Replicação do DNA, recombinação e reparo	1	3	-	1	0	1
Transcrição	0	0	-	0	0	0
Tradução	1	3	-	0	0	3
Proteínas de transporte e ligação	6	12	-	3	2	7
Outras categorias	8	10	-	4	4	8
Hipotéticas	4	16	-	4	5	13
Total	37	68	-	24	23	60

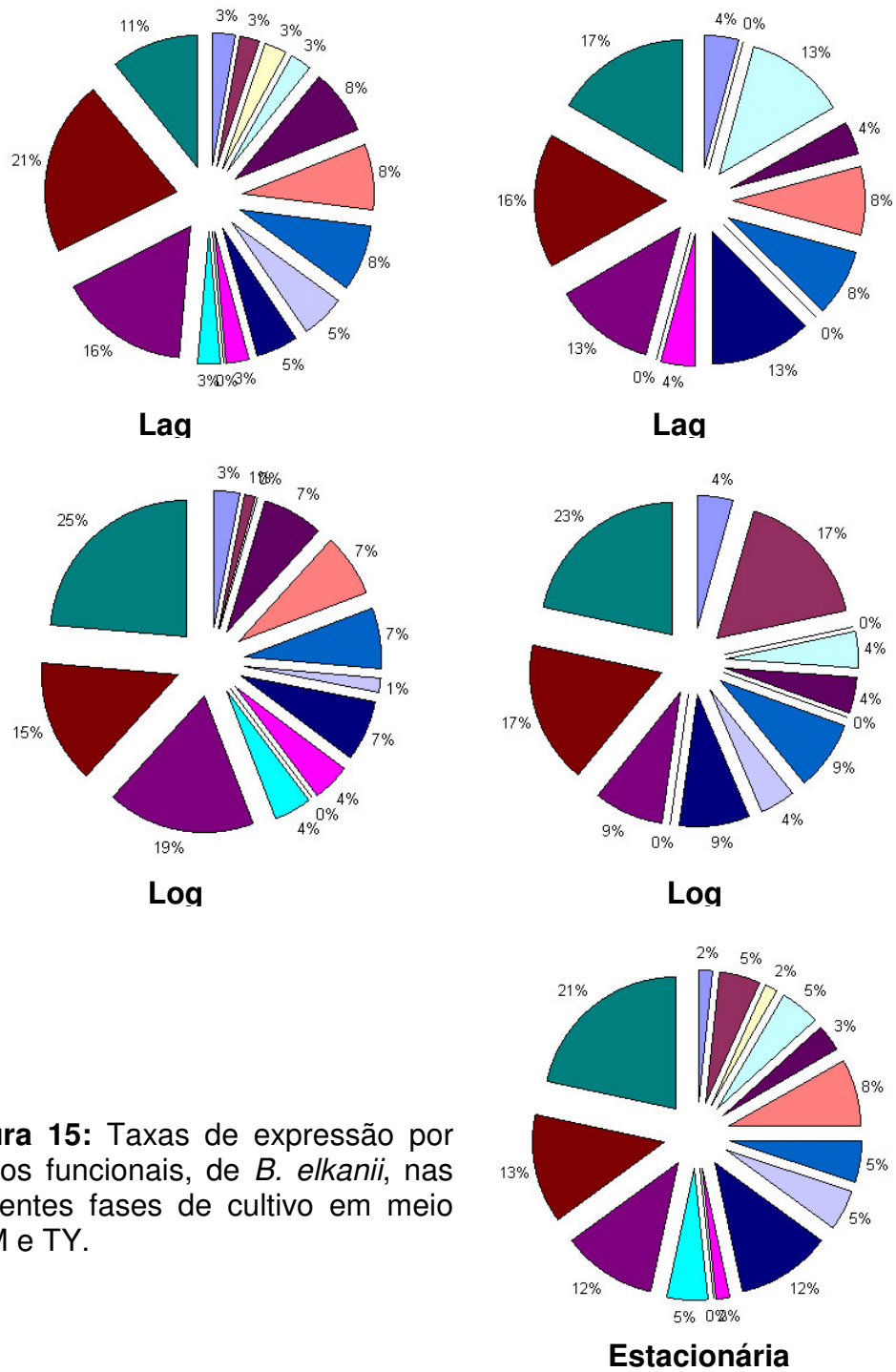
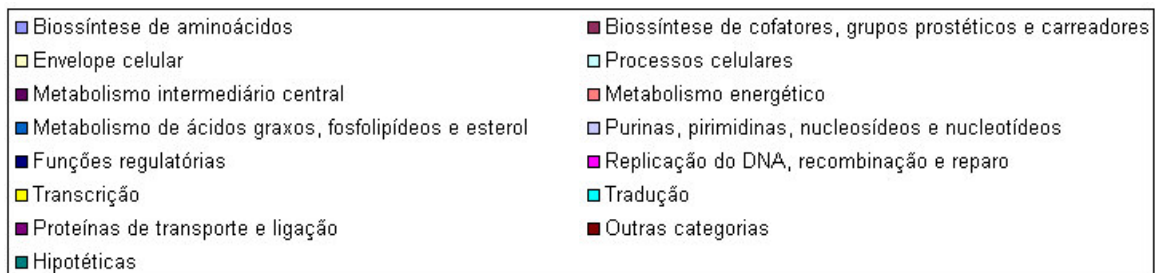


Figura 15: Taxas de expressão por grupos funcionais, de *B. elkanii*, nas diferentes fases de cultivo em meio RDM e TY.



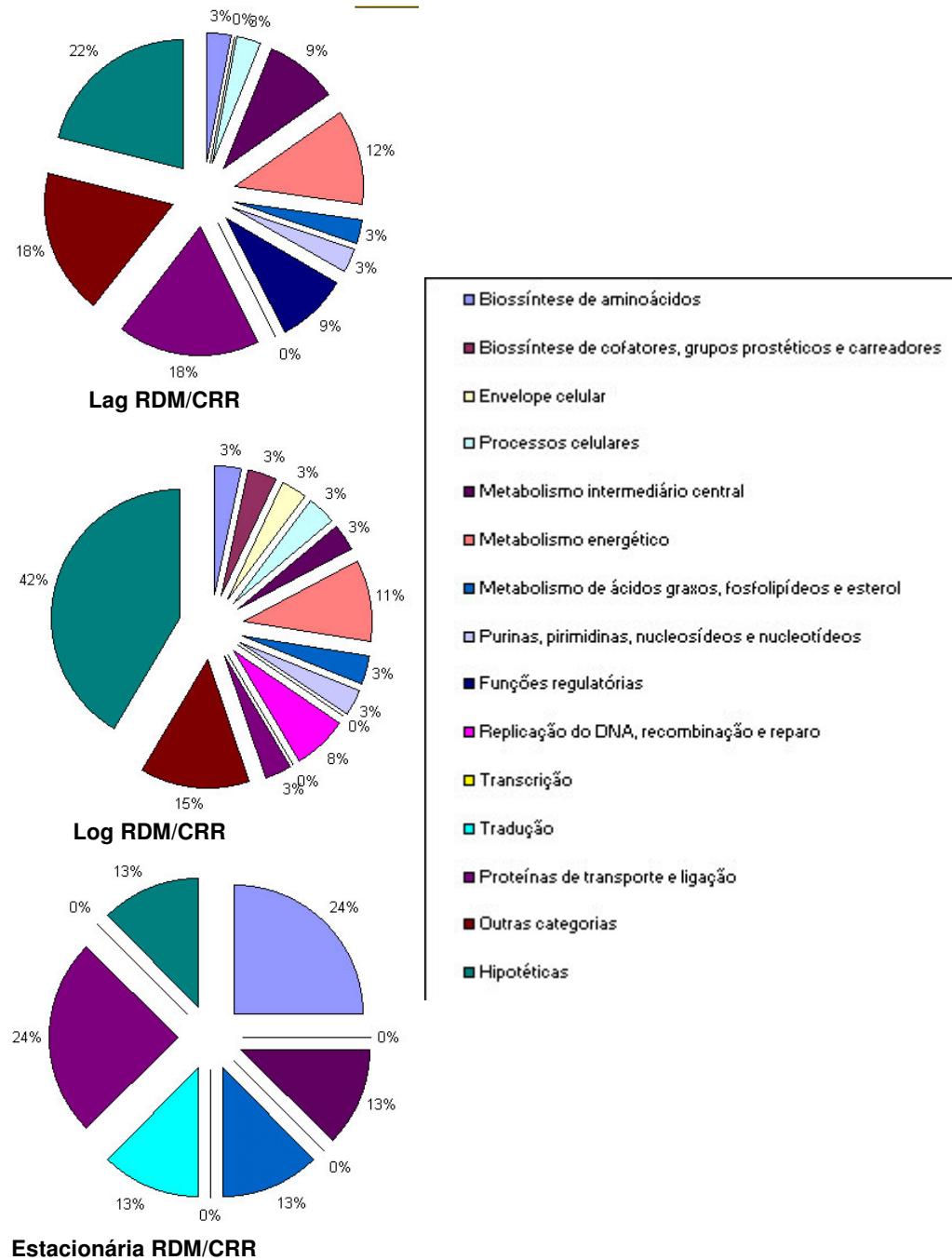


Figura 16: Taxas de expressão por grupos funcionais, de *B. elkanii*, nas diferentes fases de cultivo em meio RDM, avaliado por microarranjos de DNA hibridizados segundo a técnica de RNA de referência comum (CRR).

5. Função dos genes diferencialmente expressos em meio RDM e TY.

A lista completa de genes diferencialmente expressos em ambas as condições é apresentada detalhadamente na Tabela MS1, na seção Material Suplementar. Os genes são mostrados para cada condição em que os níveis de expressão foram superiores distintamente, em cada meio. É importante ressaltar que nos poucos casos em que genes se repetem em ambos os meios, o resultado para RDM foi obtido a partir de microarranjos associados à CRR.

5.1. Biossíntese de aminoácidos, aparato de tradução e funções regulatórias.

Ao contrário das células que apresentaram uma taxa de crescimento mais dinâmico em TY, células em meio RDM continham provavelmente menos ribossomos e sintetizaram proteínas mais lentamente. Adicionalmente, células cultivadas em meio definido sofrem maior privação de aminoácidos que células em meio rico (TAO et al., 1999).

Considerando as fases lag e log, estas diferenças refletiram em um maior número de genes diferencialmente expressos, e aumento nos níveis de expressão, relacionado a biossíntese de aminoácidos e tradução em meio definido RDM. Destes genes, destacaram-se os envolvidos na biossíntese de aminoácidos das famílias aspartato e de cadeias ramificadas. Em meio RDM, durante fase log, ainda foi encontrado, um gene *glnD* codificador de uma uridililtransferase (Tabela 6). Esta enzima tem atuação importante na regulação da adenilação/desadenilação da glutamina sintetase, via uridilação/desuridilação de uma adeniltransferase. A glutamina sintetase, por sua vez, está envolvida na geração de compostos nitrogenados biologicamente ativos e pode ser considerada a enzima central no controle do metabolismo do nitrogênio (SHATTERS et al., 1989).

Em relação aos genes diretamente relacionados à tradução, predominaram os codificadores de aminoacil-tRNA sintetases, podendo ser citados os genes *cysS*, *leuS* e *lysS* (Tabela 7). Embora não foram encontrados genes diferencialmente expressos na

categoria relacionada à transcrição, diversos reguladores transcricionais destacaram-se dentre os genes envolvidos em funções regulatórias. Durante a fase lag, estes genes predominaram em meio TY, contudo, durante a fase exponencial de crescimento ocorreu o inverso. Dos sete genes diferencialmente expressos na fase log, com funções regulatórias envolvidos na transcrição, cinco apresentaram maiores níveis de expressão em células cultivadas em meio RDM. Membros das famílias de reguladores transcricionais TetR, AraC e LysR predominaram em meio RDM, durante as fases lag e log, enquanto a família Crp destacou-se apenas em meio TY. Na fase log, membros das famílias MarR, AsnC e AraC foram encontrados em TY (Tabela 6). A maioria destes reguladores está envolvida nas vias de catabolismo, incluindo degradação de compostos aromáticos (TROPEL & VAN DER MEER, 2004).

As bactérias desenvolveram mecanismos para neutralização e extrusão de compostos tóxicos das células. Condições de estresse ou alterações na fonte de nutrientes resultam na ativação ou repressão de genes através da interação direta de proteínas regulatórias com moléculas efetoras ou elementos transcricionais no DNA. As famílias de reguladores MerR e MarR constituem ativadores e repressores transcricionais, respectivamente. Em *E. coli* estes reguladores controlam bombas de resistência multidroga (BROOUN et al., 1999). Em rizóbios, reguladores tipo MerR e LysR atuam também na repressão dos genes de nodulação (LOH & STACEY, 2003).

A proteína regulatória AraC, em *E. coli*, exerce tanto o controle positivo como negativo do operon da arabinose. A arabinose pode ser usada como única fonte de carbono, sendo convertida a xilulose-5-fosfato que constitui um intermediário da via das pentoses. Esta conversão requer as enzimas ribulose quinase, arabinose isomerase e ribulose-5-fosfato epimerase (BLUMENTHAL et al., 1996). Um gene para a enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/osigenase (*cbbS*), associada ao metabolismo da ribulose, foi detectada em meio RDM durante a fase lag (Tabela MS1), período em que um regulador AraC também se expressou.

Sistemas regulatórios de dois componentes também foram detectados em ambos os meios, sendo que em meio RDM apenas durante a fase log (Tabela 6). Este sistema compreende o principal mecanismo pelo qual a bactéria capta os sinais

ambientais e controla os processos celulares gerais, portanto, sendo importante para a adaptação no meio. Eles tipicamente consistem de duas proteínas individuais, uma histidina quinase sensorial e um regulador de resposta (PAO & SAIER, 1995; STOCK et al., 2000).

Tabela 6: Genes diferencialmente expressos para biossíntese de aminoácidos, funções regulatórias e aparato de tradução, para meio RDM (em verde) e TY (em vermelho).

Acesso	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Biossíntese de aminoácidos			
blr6298	lag	probable asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (<i>asnB</i>)	0,65
blr6299		probable asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (<i>asnB</i>)	-0,79
bll5902	log	threonine dehydratase	1,26
bll7862		putative homoserine O-acetyltransferase	-0,64
bll6037		probable SgaA serine-glyoxylate aminotransferase	-0,61
blr0650	estac	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase(<i>hisB</i>)	0,94
Funções regulatórias			
blr4281	lag	transcriptional regulatory	1,14
bll5328		two-component hybrid sensor and regulator	0,96
blr5832		transcriptional regulatory protein MarR family	0,67
blr7984		transcriptional regulatory protein TetR family	-0,62
bll3466	log	transcriptional regulatory protein Crp family	0,70
blr3467		two-component response regulator	-0,65
blr7678		transcriptional regulatory protein AraC family	-0,69
blr5548		transcriptional regulatory protein LysR family	-0,81
bll3466	estac	transcriptional regulatory protein Crp family	1,41
blr1163		transcriptional regulatory protein MarR family	1,37
blr1096		phosphate regulon, two-component response regulator (<i>phoB</i>)	1,00
bll0904		two-component response regulator (<i>regR</i>)	0,96
bll2814		transcriptional regulatory protein AsnC family	0,89
blr8099		GTP-binding protein	0,78
Tradução			
blr3790	lag	cysteinyl-tRNA synthetase (<i>cysS</i>)	-0,87
blr0627	log	leucyl-tRNA synthetase (<i>leuS</i>)	-0,68
blr1133		lysyl-tRNA synthetase (<i>lysS</i>)	-0,69
blr6589		aminopeptidase P	-0,70
bll5087	estac	glutamyl-tRNA (amidotransferase)	0,95
blr1133		lysyl-tRNA synthetase (<i>lysS</i>)	0,89
blr3130		serine protease DO-like precursor	0,88
bll5368		serine protease	-0,69
Outros			
bll0916	log	bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (<i>glnD</i>)	-0,62

5.2. Biossíntese de nucleotídeos, replicação do DNA e divisão celular.

Enquanto genes codificadores de enzimas relacionadas a biossíntese de ribonucleotídeos purínicos foram predominantes em células cultivadas em meio mínimo, como *garS*, *KsgA* e *blr7256* (adenilato ciclase), apenas um gene, *pyrG*, relacionado a pirimidinas foi detectado em meio TY (Tabela 7). Ribonucleotídeos são posteriormente convertidos em deoxiribonucleotídeos por processos de redução. A biossíntese de ribonucleotídeos pirimidínicos é um processo mais simples que o de purínicos e é provável que, principalmente em meio rico TY, a rota de biossíntese de nucleotídeos pela via de salvamento esteja em atuação (TAO et al., 1999). Esta via envolve a utilização de compostos purínicos e pirimidínicos pré-formados por biodegradação, durante a nutrição celular.

Foi descrito que os operons de RNA ribossômico de *Escherichia coli*, uma bactéria de crescimento rápido, encontram-se sob o controle de promotores dependentes da taxa de crescimento, *rrn*. A expressão de proteínas ribossomais, fatores de tradução e aparato de transcrição estão intimamente ligados à concentração de RNA ribossômico. A eficiência da iniciação da transcrição de promotores *rrn* está fisiologicamente ligada ao estado metabólico das células, através de altas concentrações de nucleosídeos trifosfatos. Assim, a presença de nutrientes de alta qualidade no meio de crescimento resulta em concentrações elevadas de nucleosídeos trifosfatos (KEENER & NOMURA, 1996; GAAL et al., 1997).

Genes diferencialmente expressos relacionados à replicação, recombinação e reparo do DNA foram predominantes em células cultivadas em meio definido principalmente durante a fase log. Os genes *topA* e *gyrA*, respectivamente codificadores das topoisomerasas I e II, foram detectados (Tabela 7). DNA topoisomerasas impedem o emaranhamento do DNA durante a replicação atuando sobre a tensão de rotação da molécula, oferecendo um suporte giratório para o relaxamento da hélice do DNA (ZECHIEDRICH et al., 2000). Em meio rico, ainda durante a fase lag, um gene relacionado à divisão celular, *ftsK*, foi detectado (Tabela 7).

Este gene parece atuar tardiamente no processo de septação em *E. coli* (YU et al., 1998).

5.3. Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores.

Ao contrário da maior tendência observada para os genes de biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos em meio RDM, genes relacionados a biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores foram predominantes em meio rico TY. Isso pode ser explicado pelo fato de que células cultivadas em meio definido continham a maioria das vitaminas disponíveis no meio RDM, como ácido nicotínico, biotina e tiamina. Em contrapartida, em meio rico, a síntese destas vitaminas teve que ser ativada. Em meio TY, fase log, o gene de maior expressão nesta categoria foi o *thiE*, envolvido na síntese de tiamina, seguido pelos genes *hemN*, e *nadD*, relacionados a biossíntese de porfirina e nicotinamida, respectivamente (Tabela 7). O gene *pcaB*, também encontrado em meio rico, participa da produção de succinato e acetil-CoA. Em meio RDM, foram encontrados genes diferencialmente expressos envolvidos na biossíntese de cobalamina, *cobD*, e porfirina, *hemE*, respectivamente nas fases lag e log (Tabela 7).

Quanto aos transportadores e proteínas de ligação, em ambos os meios destacaram-se os transportadores da família ABC (“ATP Binding Cassete”) (Tabela 7). Estes transportadores formam uma classe especial de proteínas de membrana, caracterizada pela ligação ao ATP e pela presença de grandes domínios transmembrana múltiplos. Vários membros desta família são transportadores ativos que atuam na modulação de eventos celulares como absorção, metabolismo, efetividade celular e toxicidade (GLAVINAS et al., 2004). Em meio RDM, outros “symporters” e “antiporters” foram detectados (Tabela 7), responsáveis pelo fluxo de íons que regulam o pH intracelular e íons metálicos que atuam como cofatores enzimáticos. No meio RDM, FeSO_4 estava presente como fonte de ferro, enquanto meio TY continha, provavelmente, uma mistura complexa de diferentes fontes de ferro. Em *Sinorhizobium*

meliloti cultivado em meio TY, um considerável número de genes relacionados a biossíntese de sideróforos pôde ser observado (BECKER et al., 2004).

Tabela 7: Genes diferencialmente expressos para biossíntese de nucleotídeos, cofatores, grupos prostéticos e carreadores, replicação do DNA, divisão celular e proteínas transportadoras e de ligação, para meio RDM (em verde) e TY (em vermelho).

Acesso	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos			
blr4125	Lag	5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase (<i>garS</i>)	-0,86
blI4102		rRNA-adenine N6,N6-dimethyltransferase (<i>ksgA</i>)	-0,96
blr7256	Log	putative adenylate cyclase	-0,93
blI4805		CTP synthase (<i>pyrG</i>)	0,66
blr7737	Estac	putative adenylate cyclase	0,92
blr7371		carbamoylphosphate synthase small chain (<i>carA</i>)	1,07
blI4805		CTP synthase(<i>pyrG</i>)	1,06
Replicação, recombinação e reparo do DNA			
blI0572	Lag	putative DNA topoisomerase I	0,67
blI0875		recombinase	-0,97
blr5111	Log	DNA topoisomerase I (<i>topA</i>)	-0,63
blI4696		DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>)	-0,67
blI5057		topoisomerase II (<i>gyrA</i>)	-1,14
blI0572	Estac	putative DNA topoisomerase I	0,93
Processos celulares			
blr0616	Lag	cell division protein (<i>ftsK</i>)	0,89
Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores			
blr3257	Lag	cobalamin biosynthesis protein(<i>cobD</i>)	-0,87
blI7942	Log	probable 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (<i>pcaB</i>)	0,82
blI7086		anaerobic coproporphyrinogen III oxidase (<i>hemN</i>)	0,79
blI2399		uroporphyrinogen decarboxylase (<i>hemE</i>)	-0,65
blr0430		nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (<i>nadD</i>)	0,60
blr6658		thiamine-phosphate pyrophosphorylase (<i>thiE</i>)	0,90
blI7086	Estac	anaerobic coproporphyrinogen III oxidase (<i>hemN</i>)	1,68
blr0430		nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (<i>nadD</i>)	1,21
blr2404		probable gamma-glutamyltranspeptidase precursor (<i>ggt</i>)	0,77
Proteínas transportadoras e de ligação			
blI3383	Lag	ABC transporter permease protein	1,19
blr1485		sulfate ABC transporter ATP-binding protein	-0,63
blr1452		ABC transporter ATP-binding protein	-0,85
blI8038		putative manganese transport protein	-0,86

blr5671		ABC transporter permease protein	-0,98
blr0971	Log	ABC transporter ATP-binding protein	0,60
blI0731		glycerol-3-phosphate ABC transporter membrane spanning protein	-0,63
blr4039		ABC transporter substrate-binding protein	-0,64
blr4115		putative symporter	-0,67
blr3904		probable iron transport protein	-0,69
blI3739		probable Na ⁺ /H ⁺ antiporter	-0,78
blr3568	estac	ABC transporter permease protein	1,24
blI6293		HlyB/MsbA family ABC transporter	1,08
blI1193		integral inner membrane metabolite transport protein (<i>mtbA</i>)	0,85
blI7341		RhtB family transporter (<i>rhtB</i>)	-0,56

5.4. Metabolismo intermediário central e energético.

A biossíntese dos componentes estruturais celulares e da maquinaria bioquímica que as células utilizam para regeneração, manutenção e divisão, ocorre graças ao anabolismo de macromoléculas como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Com esta finalidade, as células partem dos constituintes primários obtidos a partir dos nutrientes do meio. Tais processos requerem energia, proporcionada na forma de ATP, que foi gerada durante o catabolismo. Após os processos degradativos primários dos diferentes nutrientes, as moléculas geradas são convertidas a uma molécula comum e mais simples. Tanto proteínas, carboidratos e lipídeos são convertidos a acetil coenzima-A. É a partir desta molécula que o metabolismo é conduzido para a produção de energia, que as células utilizam para realizar os processos vitais.

As células cultivadas em meio rico não mostraram expressões marcantes de genes envolvidos no metabolismo do carbono, nitrogênio e energético. Por outro lado, seguindo a tendência da expressão de genes envolvidos na biossíntese de unidades para a produção de macromoléculas, células cultivadas em meio definido apresentaram uma expressão mais pronunciada de genes relacionados ao metabolismo intermediário central e energético (Tabela 8). Glicerol constituiu a única fonte de carbono para células cultivadas em meio definido, sendo utilizado de maneira muito eficaz. O metabolismo ocorre via glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase, produzindo gliceraldeído-3-fosfato que é, então, convertido em piruvato (ARIAS & MARTINEZ-DE-DRETS, 1976).

Durante fase log, em meio RDM, especificamente, um gene bll0731 relacionado a um transportador ABC para glicerol-3-fosfato foi detectado com maior nível de expressão (Tabela 7). O piruvato via acetil Co-A, pode então ser descarboxilado através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA ou ciclo de Krebs), formar oxaloacetato ou, ainda, ser reduzido a lactato (DUNCAN & FRAENKEL, 1979). Genes envolvidos no metabolismo do piruvato e acetil-CoA diferencialmente expressos em meio RDM são mostrados na Tabela 8.

Em meio rico, o metabolismo de carboidratos através da glicólise deve ocorrer através da via Entner-Doudoroff (MARTINEZ-DE-DRETS & ARIAS, 1972) com operação simultânea da via Embden-Meyerhof-Parnas (MULONGOY & ELKAN, 1977a; MULONGOY & ELKAN, 1977b), embora frutose-1,6-bisfosfato aldolase esteja presente em níveis reduzidos 6-fosfogluconato desidrogenase NADP⁺-dependente esteja ausente. Contudo, uma 6-fosfogluconato desidrogenase NAD-dependente ocorre em *Bradyrhizobium*, sugerindo a operação de uma nova via (KUYKENDAL, 2005). Até o momento, nenhuma destas enzimas foi encontrada no genoma de *B. elkanii*.

Ainda em RDM, a limitação em carboidratos pode ter induzido a expressão de genes envolvidos na produção de metabólitos energéticos através do metabolismo de lipídeos. Nesta classe, alguns genes relacionados à biossíntese de coenzima A presentes na categoria Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol foram detectados em meio definido (Tabela 8). Por outro lado, em meio TY, o gene *zwf*, envolvido na glicólise foi detectado durante a fase estacionária. Provavelmente, este gene pode ter sido induzido nesta fase para a utilização de reservas de poli-β-hidroxibutirato (PHB). A molécula de PHB consiste em um polímero para armazenamento de carbono, cuja produção começa com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formação de acetoacetil-CoA e redução em D-β-hidroxibutiril-CoA, o qual é finalmente incorporado na molécula de PHB (TOMBOLINI et al., 1995).

Durante a fase lag, a presença das citocromos oxidase *coxP*, detectada em meio RDM, e *cyoB* e bll3728 em meio TY (Tabela 8), sugerem que a respiração aeróbica foi elevada nestas condições iniciais de cultivo. Contudo, como a única fonte de aeração da cultura líquida de ambos os meios foi agitação orbital, é possível que com o passar

do tempo, e o aumento da densidade populacional, um ambiente microaeróbico tenha sido gerado. Esta limitação de oxigênio pode ter simulado uma condição simbiótica induzindo a expressão de alguns genes relacionados à simbiose e fixação do nitrogênio (Tabela 9), a partir daí e nas fases seguintes. Uma citocromo-c oxidase simbiótica, *fixN*, foi detectada em meio RDM durante a fase log (Tabela 9). Os genes *fixNOQP* codificam uma citocromo-c oxidase especificamente requerida para a respiração do bacterióide (FISCHER, 1994). Esta idéia pode ser corroborada pela detecção de genes para superóxido dismutase e catalase em meio TY (Tabela 9), respectivamente nas fases lag e estacionária. No entanto, estes genes para detoxificação celular podem estar simplesmente atuando no processo de tolerância ao período adaptativo e de estresse em cada fase, lag e estacionária.

Um resultado inesperado consistiu no aparecimento em meio TY, durante fase estacionária, da expressão de um gene *hupK* (Tabela 9), uma vez que a espécie *B. elkanii* é classificada com Hup⁻, ao contrário de *B. japonicum* que é Hup⁺ (MINAMISAWA, 1989). Este gene faz parte de um operon que codifica o sistema hidrogenase. Este sistema “hydrogen uptake” oxida o hidrogênio produzido pela nitrogenase e esta reciclagem de H₂ reduz perdas energéticas (EVANS et al., 1988).

Tabela 8: Genes diferencialmente expressos para metabolismo intermediário central, energético e de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol, para meio RDM (em verde) e TY (em vermelho).

Acesso	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Metabolismo intermediário central			
blr6768	lag	glycogen branching enzyme (<i>glgB</i>)	-0,99
blI2065		carbonic anhydrase (<i>icfA</i>)	-0,85
blI7271		carbon monoxide dehydrogenase large chain	-1,11
blI0199	log	probable nitrile hydratase regulator	-0,62
blr2806		nitrite extrusion protein	-0,64
blr0725		nitrogen regulatory IIA protein (<i>ptsN</i>)	-0,76
bsr1750		ferredoxin (<i>fer3</i>)	-0,85
Metabolismo energético			
blr3728	lag	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit	1,17
blr0150		cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I (<i>cyoB</i>)	1,15
blI3782		cytochrome C oxidase (<i>coxP</i>)	-0,85
blI8141	log	phosphoenolpyruvate carboxykinase (<i>pckA</i>)	-0,65
blr4655		Phosphoenolpyruvate synthase (<i>ppsA</i>)	-0,74
blr3958		putative acetyl-coenzyme A synthetase	-1,00
blI4782		pyruvate dehydrogenase beta subunit (<i>pdhB</i>)	-0,64
blr6760	estac	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (<i>zwf</i>)	1,10
blI0322		probable trehalose-6-phosphate synthase (<i>otsA</i>)	1,05
blI0323		probable trehalose-phosphatase (<i>otsB</i>)	0,95
blI5920		UDP-glucuronic acid epimerase (<i>lspL</i>)	0,93
blI2210		multicopper oxidase (<i>copA</i>)	1,13
Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol			
blr2947	lag	probable acyl-CoA dehydrogenase	1,19
blI6043		enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	0,91
blI3855		putative acyl-CoA dehydrogenase	-0,67
blI6363	log	putative acyl-CoA dehydrogenase	0,81
blI4711		fatty acid CoA ligase	0,81
blr1046		long-chain-fatty-acid-CoA ligase	-0,59
blr5668		B-ketoadipate enol-lactone hydrolase (<i>pcaD</i>)	-0,61
blr3955	estac	acyl-CoA dehydrogenase	1,26
blr0981		acyl-CoA dehydrogenase	1,23
blI2948		putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0,79
blr0139		putative acyl-CoA dehydrogenase	-0,54

Tabela 9: Genes diferencialmente expressos iduzidos em condições microaeróbicas e relacionados à simbiose e fixação do nitrogênio, para meio RDM (em verde) e TY (em vermelho).

Acesso	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Fixação do nitrogênio			
blr7496	lag	nitrogen fixation protein	0,89
blr1770	log	Molybdenum processing protein (<i>nifQ</i>)	0,74
blr2763		cytochrome-c oxidase (<i>fixN</i>)	-0,67
blr1756	estac	nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein (<i>nifS</i>)	0,91
blr1756		nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein(<i>nifS</i>)	-0,63
Hidrogenase			
blI6933	estac	HupK protein (<i>hupK</i>)	0,88
Detoxificação			
blI7774	lag	superoxide dismutase	1,13
blr0778	estac	catalase	1,14
Simbiose			
blr2025	lag	acyl transferase (<i>nodA</i>)	1,00
blI1631	log	GDP-mannose 4,6-dehydratase (<i>noeL</i>)	-0,68
blr3959		nodulation protein N (<i>nodN</i>)	-1,00

Parte III – Transcriptômica: Análise da expressão gênica de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “in vitro”, meio YMB, e em simbiose com plantas de soja, avaliado por microarranjo de DNA.

1. Nodulação de plantas de soja cultivadas em vermiculita.

Plantas de soja (*G. max*) foram inoculadas com uma cultura de células de *B. elkanii* em meio YMB, fase log. O processo de nodulação mostrou-se eficiente neste sistema (Figura 17), provavelmente graças ao estabelecimento de uma população de *B. elkanii* na rizosfera, utilizando a vermiculita como suporte para a formação de biofilmes. Uma vez estabelecida esta população, bactérias podem migrar para as regiões mais profundas do substrato conduzidas pela água utilizada durante a hidratação. Adicionalmente, exudatos das raízes das plantas, utilizados como nutrientes pelas bactérias, ou como sinais para estabelecimento da simbiose, devem se difundir de forma mais restrita à zona de interação dos pêlos radiculares. Os nódulos se concentraram no ponto de aplicação do inóculo, próximo ao colo das plantas, na raiz principal.

Três estágios de desenvolvimento do processo simbiótico de fixação do nitrogênio atmosférico, por *B. elkanii* associado a plantas de soja (Figura 17), foram escolhidos para análise dos genes diferencialmente expressos nos bacterióides. Estas fases correspondem aos períodos: 1) “N hunger”, aproximadamente 13 d.a.i. (dias após inoculação), quando a planta consome N da reserva dos cotilédones; 2) maior atividade nitrogenase, aproximadamente 28 d.a.i., quando cessam o período “N hunger” e o processo de nodulação; e 3) florescimento da planta, aproximadamente 48 d.a.i., no qual ocorre um maior “input” de N para reserva nos grãos (CATTELAN & HUNGRIA, 1994; GULDEN & VESSEY, 1998).

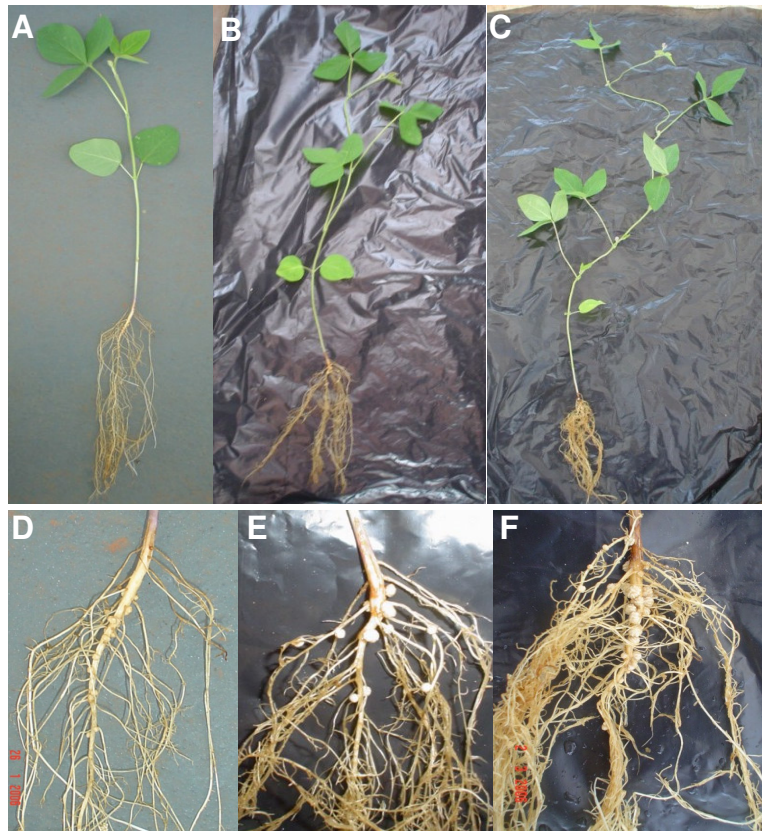


Figura 17: Nodulação de raízes de plantas de soja (*Glycine max*) utilizando a SEMIA 587 como inoculante. (A) e (D) Plantas 13 d.a.i (estágio V3).; (B) e (E) Plantas 28 d.a.i. (estágio V5); (C) e (F) Plantas 48 d.a.i. (Estágio R1). d.a.i. = dias após inoculação.

2. Perfil de qualidade do RNA total isolado de bacterióides.

O perfil de qualidade (Figura 18) e rendimento do RNA (Tabela 10) de bacterióides de *B. elkanii* foi verificado nos dias 13, 28 e 48 dias após inoculação. A relação 260/280 nm manteve-se dentro do esperado e o rendimento aumentou com a idade dos nódulos. Em nódulos determinados, como no caso das plantas de soja, o microssimbionte consiste de uma população uniforme em termos de idade desenvolvimental (KARR et al., 1990). Esta característica de nódulos determinados facilita estudos de bioquímica do metabolismo bacterióide.

KARR & EMERICH (1996) mostraram que a síntese de proteínas em *Bradyrhizobium japonicum* foi dependente da idade dos nódulos dos quais os bacterióides foram isolados, correspondendo a 14, 19 e 39 dias após plantio das sementes de soja inoculadas. Foi observado que a síntese protéica declina em função do avanço da idade, porém, é inversamente proporcional à atividade de redução do acetileno, durante a fase ativa de fixação do nitrogênio.

Neste trabalho, para *B. elkanii*, foi quantificado o RNA total, e não o mensageiro. Aparentemente, na fase inicial da simbiose, 13 d.a.i., destaca-se o RNA ribossomal requerido para a maquinaria de síntese protéica (Figura 18). Embora não se possa fazer a mesma correlação com a síntese de proteínas, sem estudos adicionais, o período de 48 d.a.i. apresentou o menor número de genes diferencialmente expressos para o bacterióide, conforme será discutido a seguir.

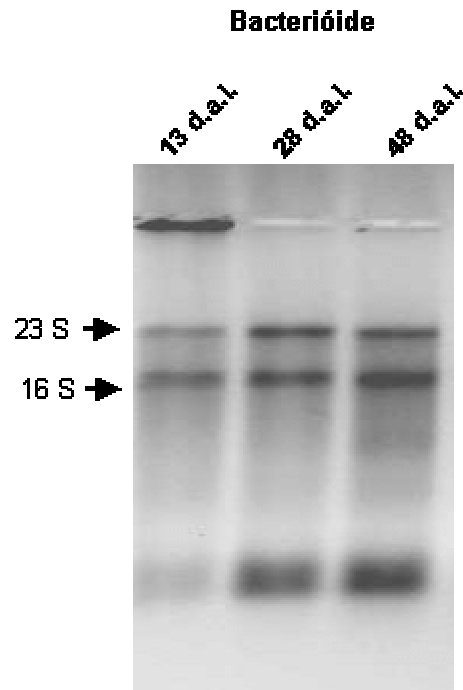


Figura 18: Perfil de qualidade do RNA total de bacterióides de *B. elkanii* SEMIA 587, isolados de nódulos de soja nos dias 13, 28 e 48 dias após inoculação (d.a.i.), avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante.

Tabela 10: Rendimento médio de RNA total obtido de bacterióides de *B. elkanii* SEMIA 587, isolados de nódulos de soja nos dias 13, 28 e 48 dias após inoculação (d.a.i.).

Amostra	Relação 260/280 nm	Rendimento (µg RNA / g nódulo)
13 d.a.i.	1,60	22
28 d.a.i.	1,67	31
48 d.a.i.	1,87	43

3. Parâmetros de análise da expressão gênica em bactéria e bacterióide.

Os genes diferencialmente expressos em bacterióides foram observados em relação à expressão gênica da bactéria *B. elkanii* cultivada “in vitro”, em meio YMB. Esta condição foi escolhida como referência por representar a condição metabólica das células bacterianas no momento da inoculação. A significância dos genes diferencialmente expressos foi calculada pela ferramenta estatística SAM (“Significance Analysis of Microarrays”). A interface gráfica que representa os genes diferencialmente expressos para bactéria e bacterióide, nos diferentes estágios da simbiose, é mostrada na figura 19. Com base em um “fold change” definido como 2,0, para as condições de 13 e 28 d.a.i., e 1,5, para 48 d.a.i., um valor $\log_2 r \geq 1,00$ ou $\geq 0,58$, foi considerado como indicador significativo da expressão de genes, respectivamente. A redução do “fold change” limitante da taxa de expressão para 48 d.a.i. diz respeito ao fato do menor número de genes significativos identificados, conforme discutido anteriormente. Análises para bacterióide permitiram detectar 51, 46 e 26 genes diferencialmente expressos, para 13, 28 e 48 d.a.i., respectivamente, contra 28, 47 e 23 para a bactéria em YMB, respectivamente para cada experimento independente.

Os parâmetros técnicos da análise SAM, para análise bactéria/bacterióide (Tabela 11), demonstram mais uma vez que os dados obtidos são confiáveis estatisticamente.

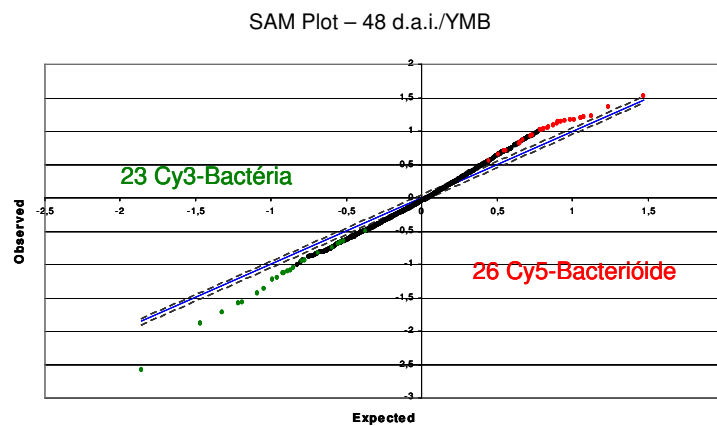
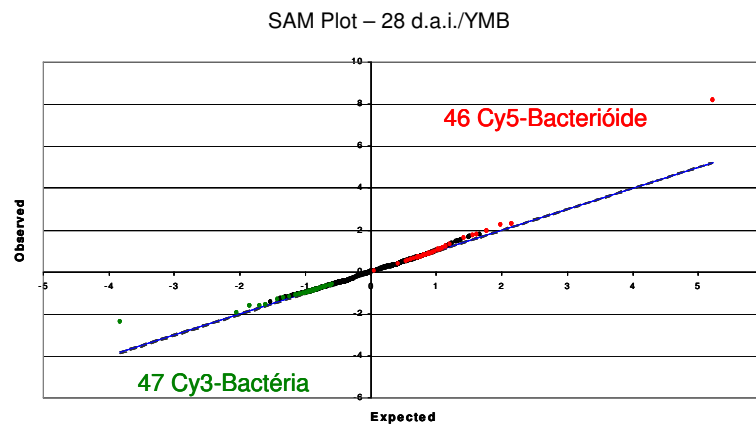
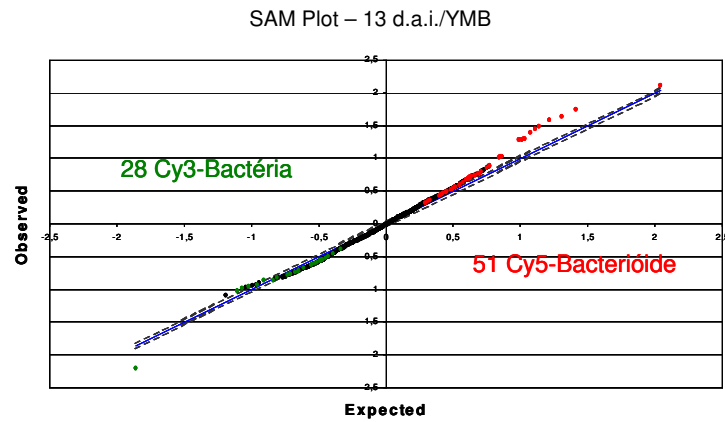


Figura 19: Identificação e distribuição dos genes diferencialmente expressos, utilizando a ferramenta SAM, em verde para a bactéria em meio YMB e em vermelho para bacterióide. Os gráficos representam a diferença relativa observada $dO(i)$ versus à diferença relativa esperada $dE(i)$, dos genes diferencialmente expressos. A linha contínua, em azul, indica quando o $d(i) = dE(i)$. As linhas pontilhadas são referentes à distância Δ da linha contínua.

Tabela 11: Parâmetros aplicados pela ferramenta SAM, durante análise dos dados, e número de genes diferencialmente expressos para *B. elkanii* SEMIA 587, bactéria em meio YMB e bacterióide em simbiose.

d.a.i. = Dias após inoculação, em plantas de soja.

BCTRD = Bacterióide.

Condição	Parâmetros de análise		Parâmetros computados					
	Fold Change	Δ Value	FSN (False Significant Number)	FDR (False Discovery Rate)	q-value (%)	Confiabilidade dos dados	# Genes significantes	# Genes diferencialmente expressos
13 d.a.i	2,0	0,039	0,88	1,11	1,0621	98,94%	79	51 Cy5 - BCTRD
								28 Cy3 - YMB
28 d.a.i	2,0	0,038	1,00	1,07	1,0752	98,92%	93	46 Cy5 - BCTRD
								47 Cy3 - YMB
48 d.a.i	1,5	0,051	0,75	0,75	1,5079	98,50%	49	26 Cy5 - BCTRD
								23 Cy3 - YMB

4. Padrões de expressão gênica de bacterióides, nos diferentes períodos de simbiose com plantas de soja.

A categorização funcional dos resultados para bacterióides é mostrada na Figura 20. Bacterióides isolados de nódulos mais jovens, 13 d.a.i., apresentaram mais genes diferencialmente expressos nas categorias Biossíntese de aminoácidos, Processos celulares, Funções regulatórias e Replicação, recombinação e reparo de DNA. Assim, embora o bacterióide já esteja simbioticamente funcional, estas categorias apresentam um metabolismo mais próximo da bactéria vida-livre. Para bacterióides maduros, com 28 d.a.i., as taxas de expressão predominantes foram para categorias Biossíntese de aminoácidos, Metabolismo intermediário central, na qual encontra-se o metabolismo de fixação do nitrogênio, e Funções de regulação. Já para bacterióides 48 d.a.i., a categoria de destaque foi Metabolismo intermediário central, com genes para fixação e

metabolismo do nitrogênio. Em todos os estágios, as categorias Proteínas de transporte e ligação, Outras categorias, englobando genes para simbiose, e Hipotéticas mostraram taxas expressivas.

Proteínas de ligação e transporte são fundamentais para o estabelecimento da simbiose e troca de produtos e fatores entre a célula do microssimbionte e do hospedeiro, através da membrana periplasmática (LODWIG & POOLE, 2003). Quanto à subcategoria simbiose, foram encontrados 2 genes para cada um dos primeiros períodos, contra nenhum no estágio de florescimento, 48 d.a.i. Por outro lado, o maior número de genes para fixação do nitrogênio foi encontrado no período de maturação, em 28 d.a.i.. A comparação entre o número de genes diretamente relacionados à simbiose e a fixação do nitrogênio, para os diferentes estágios, pode ser observado na Figura 21.

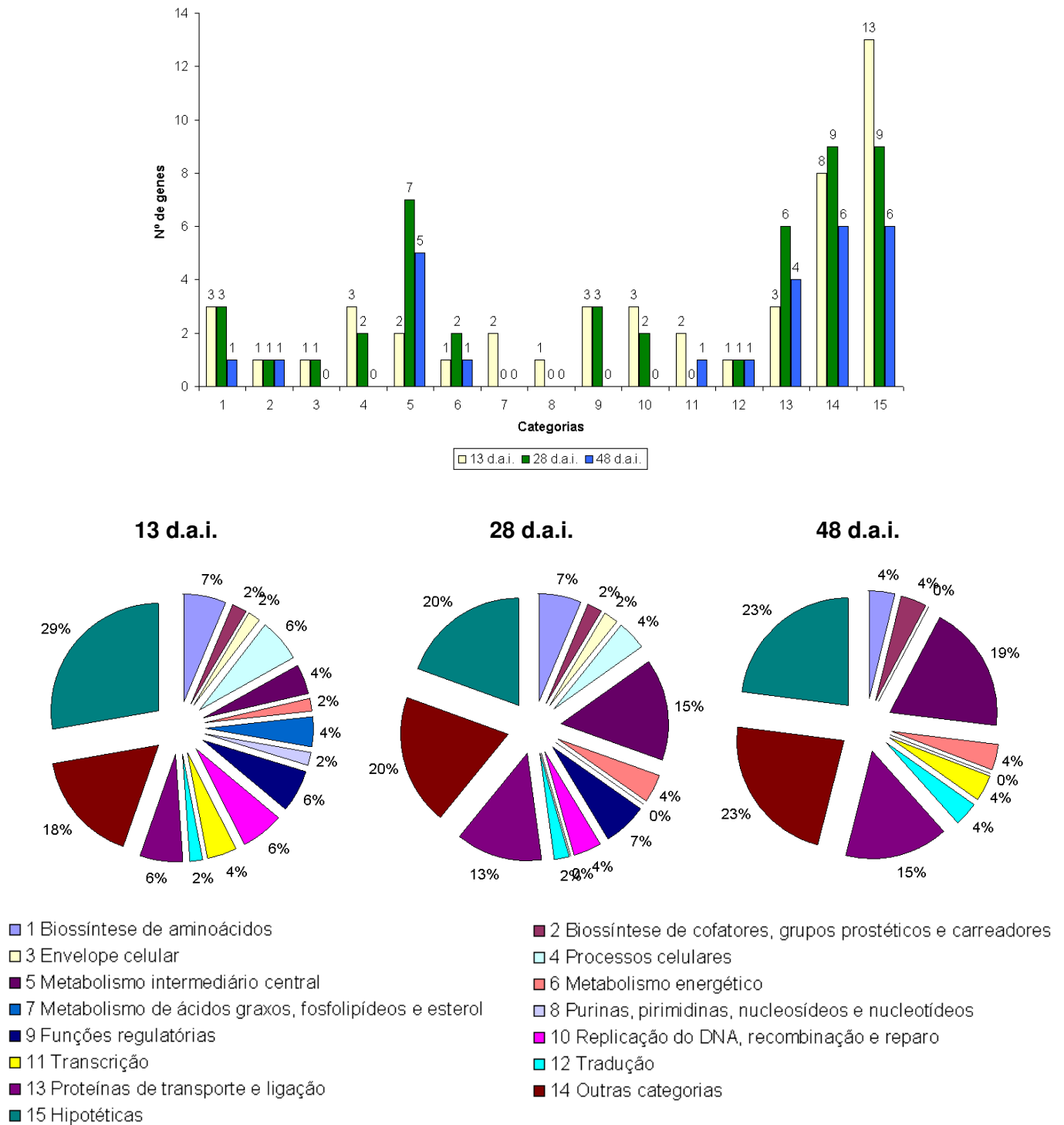


Figura 20: Distribuição categorizada individual e comparativa das taxas de expressão para os genes diferencialmente expressos no bacterióide de *B. elkanii* SEMIA 587, em diferentes estágios de simbiose com plantas de soja.

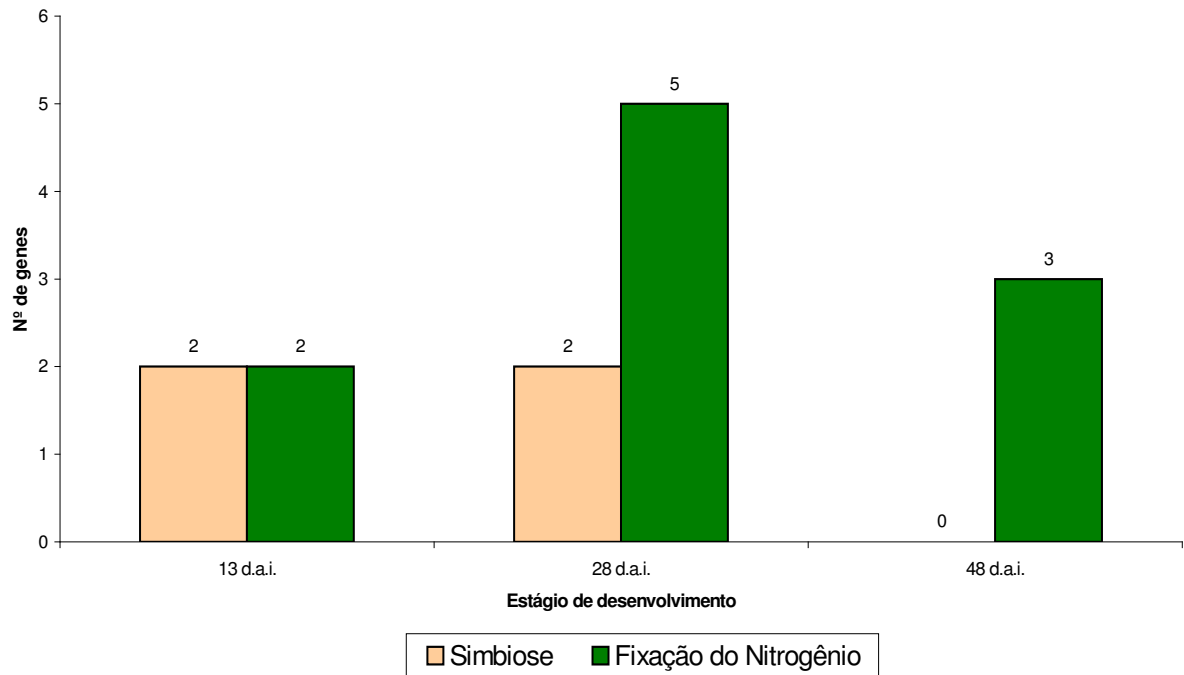


Figura 21: Gráfico comparativo do número de genes diferencialmente expressos diretamente relacionados à simbiose e a fixação do nitrogênio (RhizoBase) em bacterióides de *B. elkanii* SEMIA587, nos diferentes estágios de simbiose com plantas de soja.

5. Função dos genes diferencialmente expressos em bacterióides.

Em *B. elkanii*, o número e nível de expressão dos genes diferencialmente expressos requeridos para a biossíntese de aminoácidos apresentaram valores ($\log_2 r$) que se reduzem ao longo da idade dos nódulos (Tabela MS2). Os genes da família aspartato tiveram destaque em 13 d.a.i., *leuB* e *dapB*, e em 28 d.a.i., *blr7328* e *cysD* (Figura 22). Enquanto cerca de 80% da energia metabólica de uma célula pode ser usado para a síntese protéica, o processo de fixação do nitrogênio requer elevadas quantidades desta energia. O complexo nitrogenase requer um mínimo de 16 ATPs e 8 elétrons para redução de cada molécula de N_2 . O custo energético total para a planta é de 6 a 8 g de carbono por grama de nitrogênio reduzido (PHILLIPS, 1980). Em *B. japonicum*, a energia requerida para o rápido crescimento bacteriano parece ser direcionada para a redução do nitrogênio, durante o estado simbiótico em que cessa a divisão celular (KARR & EMRICH, 1996). Um gene para divisão celular, *ftsZ*, foi encontrado apenas em bacterióides 13 d.a.i. (Figura 22).

Anteriormente, pensava-se que íons NH_4^+ constituíam o único produto da fixação do nitrogênio secretado pelos bacterióides para as plantas, uma vez que os níveis de enzimas assimilatórias de amônio eram insuficientes para a síntese de glutamato/glutamina (BERGENSEN, 1965). Contudo, LODWIG et al. (2003) mostraram que um ciclo mais complexo de aminoácidos é essencial para a fixação do nitrogênio em nódulos de ervilha. Neste ciclo, aminoácidos fornecidos pela planta aos bacterióides, tornando-os capazes para o processo de assimilação de amônio, retornam para a planta processados para a síntese de asparagina. Os principais aminoácidos deste ciclo de reciclagem para as plantas são glutamato, aspartato e alanina, os quais se acumularam em bacterióides de *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, isolados de nódulos de soja e ervilha, respectivamente (SALMINEN & STREETER, 1992; LODWIG & POOLE, 2003).

Em *B. elkanii*, adicionalmente aos genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos da família aspartato, foram encontrados genes para o metabolismo de glutamato em bacterióides 28 d.a.i., *glnA* e *glnB* (Figura 22). Estes genes codificam a

glutamina sintetase e uma proteína regulatória para assimilação do nitrogênio, respectivamente. Assim, os dados obtidos concordam com a literatura, evidenciando este ciclo de reciclagem de aminoácidos em *B. elkanii*. Este fato é corroborado pela presença dos transportadores ABC encontrados em todas as fases, que podem estar envolvidos no transporte de aminoácidos através da membrana. Adicionalmente, em 28 d.a.i. foi detectada uma urocanase (*hutU*) (Figura 22), envolvida nas vias metabólicas de degradação de histidina, prolina, arginina, glutamato e glutamina.

Em 28 e 48 d.a.i. foram encontrados ainda os genes *pheA* (prefenato desidratase) e *trpB* (triptofano sintase), respectivamente (Figura 22). Em plantas e bactérias, os aminoácidos fenilalanina e tirosina são sintetizados a partir do corismato por meio de vias que empregam o prefenato como intermediário comum. As enzimas corismato mutase, prefenato desidrogenase e prefenato desidratase participam desta via. Embora a enzima prefenato desidratase (*pheA*) não seja membro da via biossintética específica para o triptofano, este último inibe a atividade enzimática através de um mecanismo semelhante ao de retroalimentação exercido pela fenilalanina. Assim, os genes *pheA* e *trpB*, juntamente com *glnA* e *glnB*, estariam envolvidos na regulação do ciclo de aminoácidos controlando a concentração de nitrogênio orgânico e íons amônio no bacterióide.

O triptofano também é um precursor para a síntese do fitormônio AIA (ácido 3-indolacético). Um balanço entre auxinas e citocininas, também produzidas pela planta hospedeira, é fundamental no estímulo da nodulação. O gene *trpB* em *Rhizobium etli* é essencial para uma interação simbiótica efetiva em *Phaseolus vulgaris* (TATÉ et al, 1999). Contudo, nesta etapa de desenvolvimento, 48 d.a.i., em que o processo de nodulação não deveria estar ocorrendo nas plantas de soja inoculadas com *B. elkanii*, este gene pode estar atuando como regulador de outros processos relacionados à simbiose, uma vez que a planta hospedeira inicia a fase de florescimento neste período.

O Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) está ativo nos bacterióides durante todas as fases analisadas, demonstrado diretamente pela presença dos genes *nuoF* (NADH desidrogenase), 13 d.a.i., *cis* (citrato sintase), 28 d.a.i., e *blI4784* (aldeído desidrogenase) relacionado ao metabolismo de piruvato e acetil-CoA em 48 d.a.i (Figura 22). A

atividade de todas as enzimas do ciclo TCA foi confirmada em bacterióides de *B. japonicum* (KARR et al., 1984). Embora a fixação do nitrogênio ocorra em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, os bacterióides apresentam metabolismo respiratório aeróbio, portanto, dicarboxilatos precisam ser metabolizados para obtenção de energia. Contudo, nestas condições, este ciclo não deve estar operando em sua plena atividade.

O ciclo TCA requer um balanço preciso de entrada e remoção de esqueletos carbonados, assim como potencial energético e redutor para atuar. Quando o balanço redox, baseado na taxa NADH/NAD^+ , for muito alto ou muito baixo o ciclo é inibido. Altas concentrações de NADH, “in vitro”, ou relações desbalanceadas destes compostos, inibiram as enzimas 2-oxoglutarato deidrogenase, citrato sintase, malato deidrogenase e isocitrato desidrogenase em bactérias ou bacterióides de *B. japonicum* e *M. ciceri* (SALMINEN & STREETER, 1990; KARR & EMERICH, 2000). Assim, em *B. elkanii*, a detecção do gene *nuoF* diferencialmente expresso em 13 d.a.i, pode ter papel importante na regulação do metabolismo do ciclo TCA, através do balanço redox, permitindo, em seguida a atividade da enzima citrato sintase, cujo gene *cis* foi diferencialmente expresso no período posterior, 28 d.a.i..

Em bacterióides com 28 e 48 d.a.i. foram encontrados os genes *phbc* e *glga*, respectivamente (Figura 22), indicando a síntese e acúmulo das reservas poli- β -hidroxibutirato (PHB) e glicogênio. O metabolismo do PHB por bacterióides pode ter papel regulatório na captura de carbono e agentes redutores a partir do ciclo TCA, sob condições microaeróbicas, impedindo a inibição enzimática pelo acúmulo de redutores e balanceando a quantidade de carbono metabolizado. O metabolismo do glicogênio pode ter papel semelhante ao do PHB, ocorrendo inclusive um fluxo de carbono entre os dois compostos. (LODWIG & POOLE, 2003).

Genes diferencialmente expressos para nodulação foram encontrados em bacterióides nos períodos 13 e 28 d.a.i, respectivamente, genes *nodN* (gene comum para nodulação) e *bll7861* (catabolismo da rizopina). Adicionalmente, ambos os períodos compartilham o gene *nodQ* (enzima bifuncional ATP-sulfurilase e APS-quinase).

O operon *nodM* produz uma glicosamina sintase que atua juntamente com *nodN*, formando um operon, no encurvamento do pêlo radicular. Foi sugerido que ambos os genes produzem substratos para a via anabólica que conduz a síntese de fatores Nod, além de que NodN poderia estar envolvido na excreção de outros fatores Nod (BAEV et al., 1992). Já a rizopina (L-3-O-methyl-scylo-inosamine) é um composto opina-símile envolvido na especificidade da simbiose, encontrado em *Sinorhizobium meliloti*. Postulou-se que linhagens capazes de sintetizar (genes *mos*) e catabolizar (genes *moc*) rizopina são muito mais competitivas na rizosfera (GALBRAITH et al., 1998). O gene *nodQ* corresponde ao gene *cysN*, e seu produto tem atividade ATP-sulfurilase importante na sulfatação do fator oligossacarídico comum, gerado pelos genes *nodABC*. Esta modificação no fator NodRM-1 de (*Sino*)*Rhizobium meliloti* é que induz respostas hospedeiro-específica em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L.) (SCHWEDOCK et al., 1994). Isto é indicativo de que esta modificação também pode estar ocorrendo no fator Nod comum de *B. elkanii*.

Genes para proteínas regulatórias AraC e MarR foram detectados respectivamente nos períodos 13 d.a.i. e 28 d.a.i (Tabela MS2). Enquanto o primeiro está envolvido na síntese de arabinose e metabolismo de carboidratos, o segundo pode estar envolvido na regulação dos genes de nodulação. Em 13 d.a.i., um gene para uma proteína regulatória de dois componentes (bll1199) (Tabela MS2) pode estar envolvido na ativação de genes controlados pela concentração de oxigênio, a exemplo do complexo FixL/FixJ (FISCHER, 1994).

O complexo enzimático responsável pela redução do N₂ é chamado nitrogenase. Os genes para síntese das subunidades protéicas que compõem este complexo são *nifD* e *nifK*, que codificam as subunidades α e β da ferro-molibdênio proteína (dinitrogenase), e *nifH*, que codifica as duas subunidades da ferro proteína (dinitrogenase redutase) (CRAWFOR et al., 2000). Embora estes genes não tenham sido detectados nos bacterióides de *B. elkanii* analisados, genes relacionados à fixação do nitrogênio e regulação do complexo nitrogenase foram detectados em todos os estágios: *nifS* (aminotransferase – cisteína desulfurase) (13 d.a.i.); *nifZ* (biossíntese do cofator Fe-S) e *fixR* (álcool desidrogenase) (28 d.a.i.); e *fixI* (cátion ATPase) e *fer3*

(ferredoxina) (48 d.a.i.). O gene *ndvC* (β -(1-6)-glicanasintase) foi detectado tanto nos períodos 13 e 28 d.a.i, enquanto o gene *fixN* apareceu nos estágios 28 e 48 d.a.i. (Figura 22).

Em *B. japonicum* o gene *ndvC* está envolvido na síntese de β -(1-3), β -(1-6)-D-glicanas durante crescimento em ambiente hipoosmótico. Contudo, adicionalmente ao papel osmoregulador periplasmático, estas moléculas podem ter papel específico na interação planta-micróbio, provavelmente controlando respostas de defesa do hospedeiro (BHAGWAT et al., 1996).

Os genes *nifS* e *nifZ* são requeridos para completa ativação ou estabilidade catalítica da Fe-nitrogenase, tanto pela biossíntese do cofator enzimático como pela proteção da enzima ao oxigênio (JACOBSON et al., 1989; GONZÁLEZ et al., 2003). Além do papel dos cofatores metálicos, o processo de redução do N_2 requer a doação de elétrons pela ferredoxina e flavodoxina para dinitrogenase redutase. Durante o período 48 d.a.i, início do florescimento, o gene *fer3* pode ter sido induzido a fim de manter o suprimento de elétrons para o complexo enzimático no estágio em que se dará sua maior atividade.

O gene *fixR* está envolvido em processos de oxido-redução e é codificado ao longo de um operon em que *nifA* está presente. *fixR* deve estar envolvido na ativação e inativação redox-dependente da proteína NifA, a qual, por sua vez, controla a expressão de outros genes *nif* envolvidos no processo de fixação do nitrogênio. O gene *fixI* codifica uma cátion ATPase simbiose específica, cuja função está associada a reações redox catalizadas por FixG (FISCHER, 1994).

Um gene para Fe-superóxido dismutase (*SodF*), envolvido no processo de detoxificação celular, foi detectado tanto nos períodos 13 como 28 d.a.i. (Figura 22). A planta hospedeira gera radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio durante a infecção da raiz, para combater a bactéria invasora. Estes radicais são tóxicos para a célula bacterióide podendo levar a desestabilização da membrana e inibição de atividades enzimáticas. Assim, a combinação das atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases contribuem para a degradação destas formas tóxicas de oxigênio. Adicionalmente, durante a dismutação do radical peróxido a enzima

SOD gera oxigênio. O oxigênio é amplamente demandado pelo microssimbionte no ambiente microaeróbio do nódulo, sendo que seu fluxo é controlado pela molécula denominada leghemoglobina. Assim, a presença de superóxido dismutase nos bacterióides evidencia a preservação da integridade de membranas celulares, das atividades enzimáticas no bacterióide e mantém a leghemoglobina ativa (DIMITRIJEVIC et al., 1984; BECANA et al., 1986).

A citocromo-c oxidase simbiótica (*fixN*) foi detectada nos períodos 28 e 48 d.a.i. (Figura 22). Esta citocromo-c oxidase é especificamente requerida para a respiração do bacterióide na presença de níveis baixos de oxigênio. A citocromo-c oxidase FixN atua de forma eficiente neste ambiente por apresentar K_m para O_2 muito mais baixo que o apresentado pela citocromo oxidase mitocondrial, das células vegetais. Assim, a respiração nodular em grande parte se dá pelos bacterióides. A baixa tensão de oxigênio nos nódulos mantém a atividade enzimática da nitrogenase, porém limita o metabolismo oxidativo. A respiração nos bacterióides consome oxigênio e gera ATP, requerido pela nitrogenase (CRAWFORD et al., 2000).

Mais uma vez, a detecção de um gene que desperta interesse aconteceu no período 28 d.a.i. Este gene, *hypF* (Figura 22) codifica uma proteína envolvida na maturação da hidrogenase, complexo enzimático que recicla H_2 . A estrutura da hidrogenase é codificada pelos genes estruturais *hupSL*, enquanto outros 16 genes adicionais (*hupCDEFGHIJK* / *hypABFCDEX*) estão envolvidos na maturação e atividade enzimática do complexo, embora a função para a maioria destes genes ainda não tenha sido determinada (DURMOWICZ & MAIER, 1998).

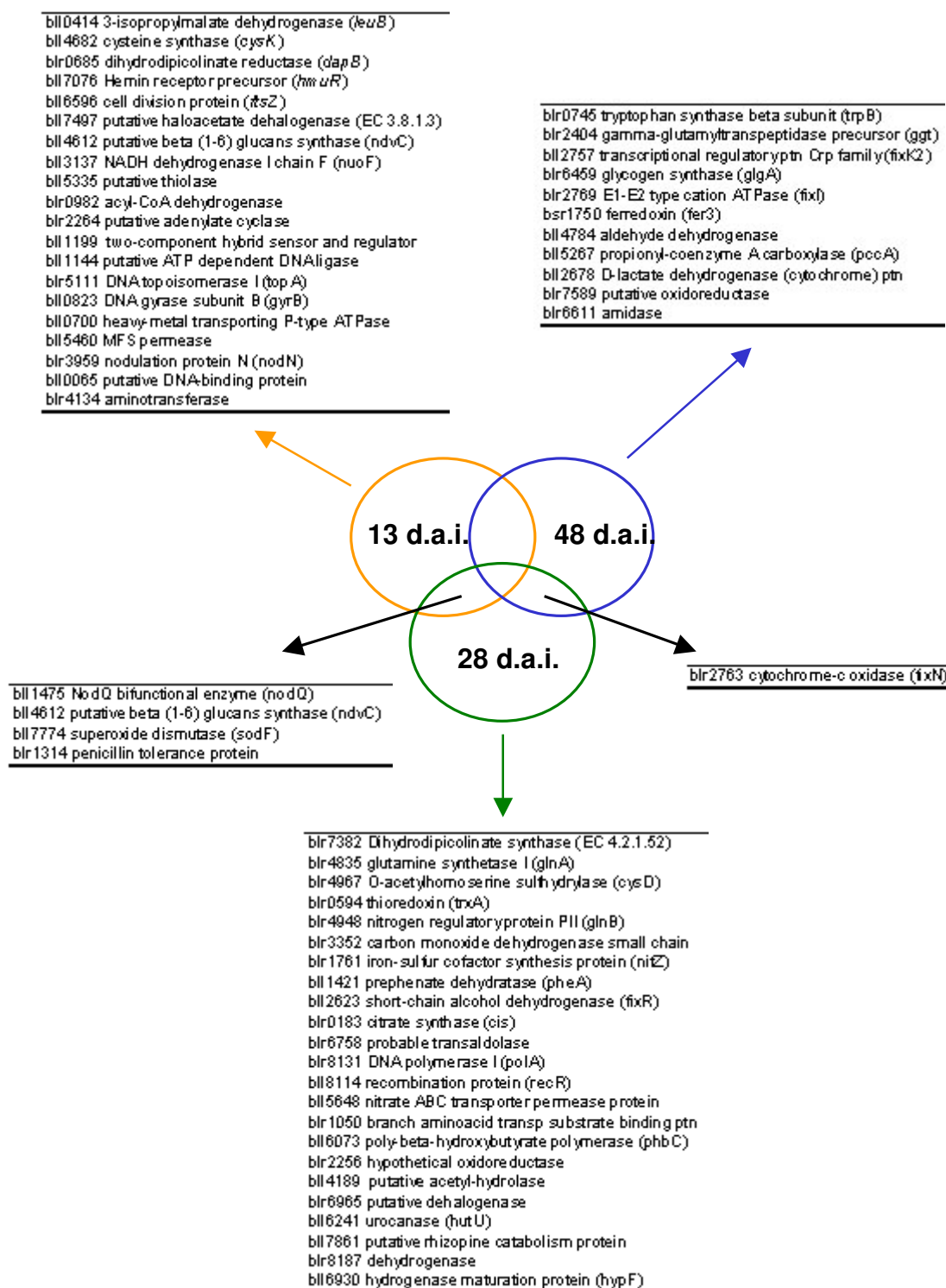
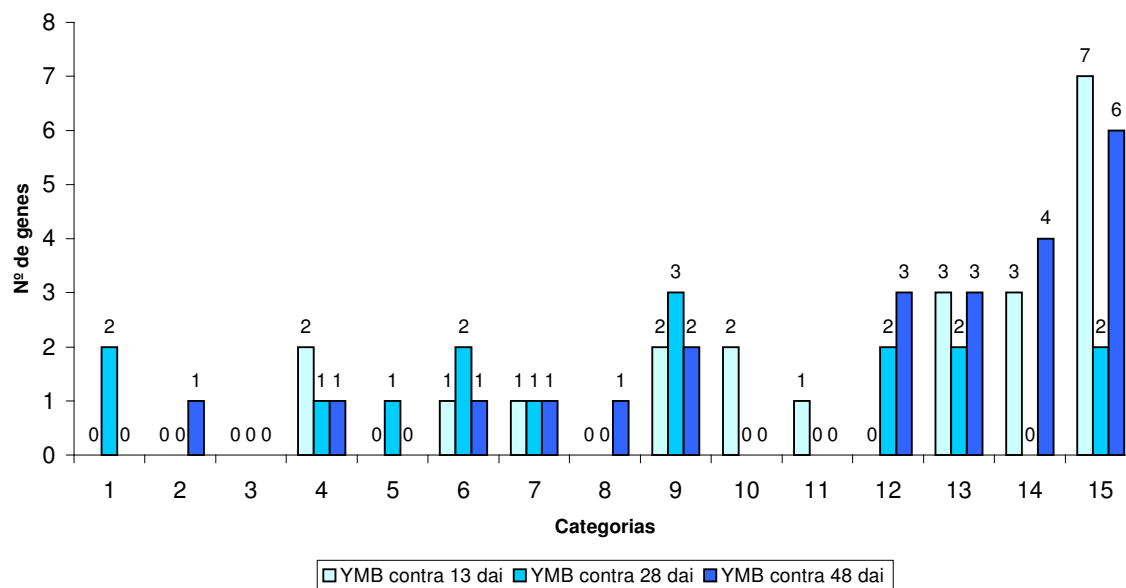


Figura 22: Genes diferencialmente expressos detectados em bacterióide de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, nos períodos 13, 28 e 48 d.a.i.

6. Genes diferencialmente expressos em bactéria cultivada em meio YMB.

A análise de genes diferencialmente expressos para *B. elkanii* em meio YMB foi efetuada como referência para os experimentos visando a identificação de genes nos bacterióides. Estas células mostram o metabolismo celular da bactéria no momento em que foram utilizadas para inoculação das plantas de soja. Portanto, embora cultivada “in vitro”, esta condição representa as bactérias de vida-livre no momento da inoculação. Para cada período analisado foram tomadas referências independentes, ou seja, microarranjos específicos para a comparação com bacterióides dos diferentes estágios. A categorização dos genes diferencialmente expressos em meio YMB é mostrada na Figura 23, enquanto os genes detectados são mostrados na Tabela MS3. Um levantamento geral categorizado destes genes não poderia ser feito pelo fato de constituírem experimentos independentes, representativos da expressão diferenciada em relação à condição contra a qual foram comparados.

Observou-se, contudo, que nos três experimentos os grupos funcionais relacionados às categorias Processos celulares, Metabolismo energético, Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol, Funções regulatórias, Tradução e Proteínas de transporte e ligação se destacaram representando a condição de fase log do cultivo “in vitro” em meio YMB (Figura 23), assemelhando-se ao comportamento da bactéria de vida-livre. Contudo, a heterogeneidade observada nas categorias para o mesmo meio nos diferentes experimentos, representa justamente a grande variação metabólica dos bacterióides nos diferentes estágios de simbiose analisados, considerando que a comparação “in vitro” e em simbiose constitui processos bastante distintos.



1 Biossíntese de aminoácidos	9 Funções regulatórias
2 Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores	10 Replicação do DNA, recombinação e reparo
3 Envelope celular	11 Transcrição
4 Processos celulares	12 Tradução
5 Metabolismo intermediário central	13 Proteínas de transporte e ligação
6 Metabolismo energético	14 Outras categorias
7 Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esteroi	15 Hipotéticas
8 Purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos	

Figura 23: Distribuição categorizada por grupos funcionais dos genes de *B. elkanii* cultivada em meio YMB.

V. DISCUSSÃO FINAL.

O fato do genoma de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 ainda estar em andamento não impediu de construir um microarranjo parcial de DNA genômico desta bactéria, para finalidades de análises de transcriptoma parcial e outras prospecções. As funções dos genes analisados neste trabalho foram atribuídas por homologia com proteínas cujas seqüências encontram-se em bancos de dados. Os dados apresentados refletem as taxas de expressão dos níveis relativos dos transcritos de genes individuais, não fornecendo indicações dos mecanismos de regulação. A tendência geral dos resultados mostrou-se clara e contundente, embora alguns dados individuais de expressão possam estar superestimados devido a problemas técnicos. Portanto, deve ser considerado que para se estudar a regulação gênica destes transcritos, verificações individuais e funcionais devem ser levadas em conta.

Dado ao grande volume de dados gerados nesta tese, os experimentos comparativos, a princípio, foram considerados mais de forma qualitativos do que quantitativos. Os valores de expressão gênica são determinados como taxas de expressão de uma condição experimental, ou teste, sobre outra condição referência, ou controle. Assim, a escolha da condição de referência tem implicações diretas sobre os resultados obtidos, uma vez que a taxa de expressão de determinado gene depende de sua expressão em ambas as condições.

O número elevado de genes enquadrados na categoria hipotéticos, em todas as análises corrobora e reflete a necessidade da ampliação da biblioteca genômica de *B. elkanii* 587. Adicionalmente, as análises de transcriptoma trazem perspectivas promissoras para futuras análises funcionais de genes independentes, ou de conjuntos de genes envolvidos em determinada função ou via metabólica.

A aparente alteração de um metabolismo respiratório aeróbio para anaeróbio parece ser um dos resultados mais intrigantes, nos experimentos de cultivo “in vitro” nos meios RDM e TY. Membros do gênero *Bradyrhizobium* podem crescer com baixos níveis de oxigênio. Adicionalmente, algumas linhagens de *B. elkanii* fixam o nitrogênio no estado de vida livre quando examinadas sob certas condições especiais de cultivo com fontes de carbono selecionadas e baixo nível de oxigênio (KUYKENDAL, 2005).

A cadeia respiratória em *B. japonicum* apresenta vários ramos, sintetizando um número de terminal-oxidases apropriadas para diferentes condições ambientais. Além da terminal-oxidase heme-cobre tipo *cbb₃*, *fixNOQP*, microaeróbica/simbiótica, sob condições aeróbicas os elétrons são canalizados do “pool” ubiquinol-10 via um complexo proteína Fe-S de Rieske/citocromo *bc₁*, genes *fbcFH*, e uma citocromo c oxidase ligada a membrana, *cycM*, para a terminal-oxidase tipo *aa₃*, sítio de redução do O₂ (BOTT et al., 1990). Genes para uma citocromo c terminal-oxidase alternativa, *coxMNOP*, também foram descritos (BOTT et al., 1992). Evidências genéticas de uma quarta terminal-oxidase, *coxX*, também foram apresentados. Esta última exhibe maior homologia com a subunidade I da citocromo oxidase *o* de *E. coli* que qualquer dos genes de terminal-oxidase de *B. japonicum* (SURPIN et al., 1994).

Quanto ao fenótipo Hup que caracteriza a atividade hidrogenase de estirpes de rizóbios, os mesmos são classificadas como Hup⁺, Hup⁻ e Hup-hr (“host regulated”). Este fator é considerado chave na eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio. Durante este processo, enquanto N₂ é reduzido a NH₄⁺ pelo sistema enzimático nitrogenase, prótons também são reduzidos a H₂. Esta produção de H₂ também é dependente de ATP, representando um desperdício de energia. Estirpes que induzem a síntese de hidrogenase são capazes de reciclar o subproduto H₂ liberado, recuperando até um terço da energia dispensada (CRAWFORD et al, 2000).

A habilidade em utilizar o H₂ é uma característica desejável para a produção de inoculantes mais eficientes e produtivos, produzindo nódulos nos quais não ocorre a perda de energia ocasionada pela redução de prótons (LEMOS, 1994). A detecção da expressão dos genes *hupK* e *hypF* em *Bradyrhizobium elkanii* também foi inesperada.

Entretanto, a expressão deste gene sem a possibilidade de análise dos outros genes do operon envolvidos no sistema dificulta a interpretação deste resultado.

A indução de genes envolvidos na simbiose e fixação do nitrogênio, durante o cultivo de *Bradyrhizobium elkanii*, deve ser considerada ao avaliar preparações de inoculantes comerciais. A simulação de um ambiente com baixa tensão de oxigênio pode estar acontecendo dentro das embalagens comerciais, durante a estocagem do produto líquido. Assim, o mesmo processo de indução destes genes, observado em nossas culturas, poderia vir a ocorrer nas formulações de inoculantes líquidos. Quanto a esta condição, duas hipóteses podem ser sugeridas, ambas das quais necessitam ser experimentalmente analisadas e estudadas. Primeiro, as células presentes no inoculante apresentam um conjunto de genes prontamente ativados para o processo de simbiose e fixação do nitrogênio no momento da inoculação, sendo favorável para a interação com a planta. Segundo, as células bacterianas, quando liberadas da embalagem para inoculação da planta, sofrem uma nova onda de indução da expressão gênica, como um retrocesso, retardando sua interação com a planta e o processo de simbiose, propriamente dito. Embora a primeira hipótese seja bastante atraente, a segunda parece ser mais adequada.

VI. CONCLUSÕES.

1. A biblioteca de DNA genômico de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 foi ampliado em 9471 clones, contabilizando 18495 clones, e um microarranjo parcial de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 contendo 2654 genes foi construído.
2. As células de *B. elkanii* SEMIA 587 possuem padrões de expressão gênica diferentes em condições de cultivo “in vitro”, nos meios RDM, TY e YMB, e em simbiose com plantas de soja.
3. A presença de genes relacionados às diferentes categorias de grupos funcionais, confere ao microarranjo de DNA Be587 a versatilidade para análises funcionais ou outras prospecções.
4. A taxa de crescimento da bactéria *B. elkanii* SEMIA 587 foi quase 4 vezes mais lenta em meio definido RDM que em meio rico TY.
5. A expressão de genes relacionados às categorias de simbiose e fixação do nitrogênio foi detectada na bactéria cultivada “in vitro”, tanto nos meios RDM como TY.
6. Os genes diferencialmente expressos em bacterióides, nos diferentes períodos de maturação, diferem em número e tipo.
7. Os genes diferencialmente expressos para nodulação foram identificados apenas em bacterióides das fases 13 e 28 d.a.i, enquanto que o maior número de genes

diferencialmente expressos para fixação do nitrogênio se deu em bacterióides da fase 28 d.a.i..

8. Os bacterióides apresentaram mais genes diferencialmente expressos relacionados à regulação dos processos de simbiose e fixação do nitrogênio, do que genes estruturais.

9. A expressão diferencial dos genes *nodQ*, *ndvC*, *sodF* e codificador de tolerância à penicilina foi compartilhada por bacterióides das fases 13 e 28 d.a.i., enquanto a do gene *fixN* foi compartilhada pelos bacterióides das fases 28 e 48 d.a.i..

10. O comportamento metabólico de *B. elkanii* SEMIA 587 em meio YMB foi semelhante ao da bactéria em vida-livre.

VII. REFERÊNCIAS.

- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.74, p.5350-5354, 1977.
- AMPE, F.; KISS, E.; SABOURDY, F.; BATUTU, J. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. **Genome Biology**, v.4(2), R15, 2003.
- ARAUJO, S.C. A inoculação de leguminosas. Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>, 1997.
- ARIAS, A.; MARTINEZ-DE-DRETS, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.66, p.150-153, 1976.
- BAEV, N.; SCHULTZE, M.; BARLIER, I.; HA, D.C.; VIRELIZIER, H.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. **Journal of Bacteriology**, v.174(23), p. 7555-7565, 1992.
- BECANA, M.; APARICIO-TEJO, P.; IRIGOYEN, J.J.; SANCHEZ-DIAS, M. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. **Plant Physiology**, v.82, p.1169-1171, 1986.
- BECKER, A.; BERGES, H.; KROL, E.; BRUAND, C.; RUBERG, S.; CAPELA, D.; LAUBER, E.; MEILHOC, E.; AMPE, F.; DE BRUIJN, F.J.; FOURMENT, J.; FRANCEZ-CHARLOT, A.; KAHN, D.; KUSTER, H.; LIEBE, C.; PUHLER, A.; WEIDNER, S.; BATUT, J. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17 (3), p.292-303, 2004.

- BERGENSEN, F. Ammonia – an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.18, p.1-9, 1965.
- BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.
- BHAGWAT, A.A.; GROSS, K.C.; TULLY, R.E.; KEISTER, D.L. β -glucans synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: Characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1-6) linkages. **Journal of Bacteriology**, v.178(15), p.4635-4642, 1996.
- BISHOP, P.E.; GUEVARRA, J.G.; ENGELKE, J.A.; EVANS, H.J. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, v.57, p.542-546, 1976.
- BLUMENTHAL, R.M.; BORST, D.W.; MATTHEWS, R.G. Experimental analysis of global gene regulation in *Escherichia coli*. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.55, p.1-86, 1996.
- BOOT, M.; BOLLIGER, M.; HENNECKE, H. Genetic analysis of the cytochrome *c-aa₃* branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. **Molecular Microbiology**, v.4, p.2147-2157, 1990.
- BOOT, M.; PREISIG, O.; HENNECKE, H. Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. **Archives in Microbiology**, v.158, p.335-343, 1992.
- BREMER, H.; DENIS, P.P. **Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate**, p.1553-1569. In NEIDBARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B. MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHACCHTER, M.; UMBARGER, H.E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2^o ed. ASM Press, Washington, D.C., 1996.
- BREWIN, N.J. (2001). Development of the legume root nodule. **Annual Review of Cell Biology**, v.7, p.191-226.
- BROOUN, A.; TOMASHEK, J.J.; LEWIS, K. Purification and ligand binding of EmrR, a Regulator of multidrug transporter. **Journal of Bacteriology**, v.181(16), p.5131-5133, 1999.

- BURK, D.; BURRIS, R.H. Biochemical nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v.10, p.587-618, 1941.
- BURRIS, R.H. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. **Plant Physiology**, v.54, p.443-449, 1974.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. e GRESSHOFF, P.M. (1991). Plant genetic control of nodulation. **Annual Review of Microbiology**, v.45, p.345-382.
- CANTÃO, M.E.; FERREIRA, J.E.; LEMOS, E.G.M. Optimal clones identifier for genomics shotgun libraries: "OC Identifier toll". **Genetics and Molecular Research**, v.6(1), 2007 (no prelo).
- CATTELAN, A.J. e HUNGRIA, M. (1994). **Nitrogen nutrition and inoculation, p.201-215. In: Tropical Soybean: improvement and production.** FAO Plant Production and Protection Series, n. 27, FAO press, Roma Itália.
- 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.88, p.392-397, 1988.
- CHEN, Y.; DOUGHERTY, E.R.; BITTNER, M.L. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. **Journal of Biomedical Optics**, v.2(4), p.364-374, 1997.
- CHOHAN, S.N.; COPELAND, L. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium (Cicer)* sp. Strain CC 1192. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2859-2863, 1998.
- CHU, G.; NARASIMHAN, B.; TIBSHIRANI, R.; TUSHER V. SAM "Significance Analysis of Microarrays". **Users guide and technical document**, 2001.
- CHURCHILL, G.A. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. **Nature Genetics Supplement**, v.32, p.490-495, 2002.
- CLEVELAND, W.S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **Journal of the American Statistical Association**, v.74, n.368, p.829-836, 1979.
- CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

- 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 Plantas*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000, p.786.
- DAVID, M.; DAVERAN, M.-L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v.54, p.671-683, 1988.
- DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABEK, E.M.; ABE, M.; PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* – clover symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.1140-1150, 1984.
- DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, P.A.; WILLEMS, U.; TORCK, R.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Description of *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. Nov., for nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p.1277-1290, 1998.
- DELORIT, R.J.; GUNN, C.R. **Seeds of continental United States legumes (Fabaceae)**. Park Falls, WI, USA, F.A. Weber and Sons, Lithographers, 1986.
- DESHMANE, N.; STACEY, G. Identification of *Bradyrhizobium nod* genes involved in host-specific nodulation. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.3324-3330, 1989.
- DHARMADI, Y.; GONZALEZ, R. DNA microarrays: Experimental issues, data analysis, and application to bacterial systems. **Biotechnology Progress**, v.20, p.1309-1324, 2004.
- DIMITRIJEVIC, L.; PUPPO, A.; RIGAUD, J. Superoxide dismutase activities in *Rhizobium phaseoli* bacteria and bacteroids. **Archives of Microbiology**, v.139, p.174-178, 1984.
- DOWNIE, J.A. **Functions of rhizobial nodulation genes**. In: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, p.387-402, 1998.

- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacteria form *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.89-98, 1988
- DUNCAN, M.J.; FRAENKEL, D.G. α -Keto glutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.37, p.415-419, 1979.
- DURMOWICZ, M.C.; MAIER, R.J. The FixK₂ protein is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v.180(12), p.3253-3256, 1998.
- ELLINGBOE, A.H. Changing concepts in host-pathogen genetics. **Annual Review of Phytopathology**, v.19, p.125-143, 1981.
- EVANS, H.J.; RUSSELL, S.A.; HANUS, F.J.; RUIZ-ARGÉSO, T. **The importance of hydrogen recycling in nitrogen fixation by legumes**. In: Summerfield JR (ed), World crops: cool season food legumes. Kluwer Academic Publishers, Boston, p.777-791, 1988.
- EWING, B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; HILIER, L.D.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.
- FERNANDEZ-PASCUAL, M.; LUCAS, M.M.; FELIPE, M.R.; BOSCA, L.; HIRT, H.; GOLVANO, M.P. Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium–Lupinus*. **Journal of Experimental Botany**, v.,57 p.2735-2742, 2006.
- FISCHER, H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological Reviews**, v.58, p.352-386.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 143p, 1928.
- FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W.J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v.387, p.394-401, 1997.

- FROBISHER, M. et al. **Cultivo y crecimiento de las bacterias**. In: Microbiologia. 5.ed. Baelona, Salvat Editores S.A., p. 126-149, 1978.
- GAAL, T.; BARTLETT, M.S.; ROSS, W.; TURNBOUGH JR., C.L.; GOURSE, R.L. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. **Science**, v.278, p.2092-2097, 1997.
- GALBRAITH, M.P.; FENG, S.F.; BORNEMAN, J.; TRIPPLET, E.W.; BRUIJN, F.J.; ROSSBACH, S. A functional *myo*-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. **Microbiology**, v.144, p.2915-2924, 1998.
- GALIBERT, F.; FINAN, T.M.; LONG, S.R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M.J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R.W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N.A.; FISHER, R.F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R.W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M.L.; KALMAN, S.; KEATING, D.H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M.C.; POHL, T.M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F.J.; WEIDNER, S.; WELLS, D.H.; WONG, K.; YEH, K.C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v.293, p.668-672, 2001.
- GARRITY, G.M. (editor) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. *Bradyrhizobiaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.1-6, 2006.
- 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, p.321-369, 1987.

- GLAVINAS, H.; KRAJCSI, P.; CSEREPES, J.; SARKADI, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. **Current Drug Delivery**, v.1, p.27-42, 2004.
- GONZALEZ, V.; BUSTOS, P.; RAMIREZ-ROMERO, M.A.; MEDRANO-SOTO, A.; SALGADO, H.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; HERNANDEZ-CELIS, J.C.; QUINTERO, V.; MORENO-HAGELSIEB, G.; GIRARD, L.; RODRIGUEZ, O.; FLORES, M.; CEVALLOS, M.A.; COLLADO-VIDES, J.; ROMERO, D.; DAVILA, G. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. **Genome Biology**, v.4(6), R36, 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.
- GÖTTFERT, M.; RÖTHLISBERGER, S.; KÜNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R.; HENNECKE, H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.1405-1412, 2001.
- GULDEN, R.H.; VESSEY, J.K. Low concentrations of ammonium inhibit nodulation (nodule number g⁻¹ root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant and Soil**, v.198, p.127-136, 1998.
- HANCOCK, D.W. Nitrogen fixation – nod gene expression and function. 2004. Disponível em : <http://www.bae.uky.edu/dhancock/research.htm>.
- HAUSER, F.; LINDEMANN, A.; VUILLEUMIER, S.; PATRIGNANI, A.; SCHLAPBACH, R.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Design and validation of a partial-genome microarray for transcriptional profiling of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region. **Molecular Genetics and Genomics**, v.275(1), p.55-67, 2006.
- HILLIER, L.D.; LENNON, G.; BECKER, M.; BONALDO, M.F.; et al. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. **Genome Research**, v.6, p.807-28, 1996.

- JARDIM-FREIRE, J.R.; COSTA, J.A.; STAMMEL, J.G. Principais fatores que propiciaram a expansão da soja no Brasil. **Revista Plantio Direto**, v.92, p.39-47, 2006.
- JARDIM-FREIRE, J.R.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.
- JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.
- JORDAN, D. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen –fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v.7, p.331-338, 2000.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v.9, p.189-197, 2002a.
- KANEKO, T. *et al.* Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Supplement). **DNA Research**, v.9, p.225-256, 2002b.
- KARR, D.B.; EMERICH, D.W. *Bradyrhizobium japonicum* isocitrate dehydrogenase exhibits calcium dependent hysteresis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.376, p. 101-108, 2000.
- KARR, D.B.; EMERICH, D.W. Protein synthesis by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids declines as a function of nodule age. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62(10), p.3757-3761., 1996.

- KARR, D.B.; SUZUKI, F.; WATERS, J.K.; EMERICH, D.W. Further evidence for the uniformity of the microsymbiotic population from soybean nodules. **Journal of Plant Physiology**, v.136, p.659-663, 1990.
- KEEN, N.T. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. **Annual Review of Microbiology**, v.42, p.421-440, 1988.
- KEENER, J.; NOMURA, M. **Regulation of ribosome syntesis**, p.1417-1431. In NEIDBARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B. MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHACCHTER, M.; UMBARGER, H.E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2^o ed. ASM Press, Washington, D.C., 1996.
- KOSSLAK, R.M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H.E.; APPELBAUM, E.R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* commun *nod*genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.84, p.7428-7432, 1987.
- KÜNDIG, C.; HENNECK, H.; GÖTTFERT, M. Correlated physical and genetic map of the *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. **Journal of Bacteriology**, v.175, p. 613-622, 1993.
- KUYKENDAL, L.D. **Genus I. Bradyrhizobium Jordan 1982, 137^{VP}**. In: D.J. BRENNER, N.R. KRIEG, J.T. STALEY, G. M. GARRITY (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 438.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.
- LEE, L.G.; CONNELL, C.R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Research**, v.21(16), p.3761-3766, 1993.
- LEMOES, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase**. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista de São

- Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1994. 108 p. (Tese de Livre-Docência).
- LETOWSKI, J.; BROUSSEAU, R.; MASSON L. DNA microarray applications in environmental microbiology. **Analytical Letters**, v.36(15), p.3165-3184, 2003.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.
- LIPSHUTZ, R.J., FODOR, S.P.A., GINGERAS, T.R. e LOCKART, D.J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, v.21, p.20-24.
- LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v.259, p.946-51, 1993.
- LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR-Methods and Applications**, v.4(6), p.357-362, 1995
- LOCKHART, D.J.; DONG, H.; BYRNE, M.C.; FOLLETTIE, M.T.; GALLO, M.V.; CHEE, M.S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E.L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature**, v.14, p.1675-1680, 1996.
- LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Science*, v.22, p.37-78, 2003.
- LODWIG, E.M.; HOSIE, A.H.F.; BOURDÈS, A.; FINDLAY, K.; ALLAWAY, D.; KARUNAKARAN, R.; DOWNIE, J.A.; POOLE, P.S. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. **Letters to Nature**, v.422, p.722726, 2003.
- LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, v.69(1), p.10-17, 2003.
- LOH, J.T.; YUEN-TSAI, J.P.Y.; STACEY, M.G.; LOHAR, D.; WELBORN, A.; STACEY, G. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. **Molecular Microbiology**, v.42, p.37-46, 2001.

- LONG, S.R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **Plant Cell**, v.8, p.1885-1889, 1996,
- LÓPEZ-GARCIA, S.L.; VÁZQUEZ, T.E.E.; FAVELUKES, G.; LODEIRO, A.R. Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.7241-7252, 2001.
- LÓPEZ-GARCIA, S.L.; VÁZQUEZ, T.E.E.; FAVELUKES, G.; LODEIRO, A.R. Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. **Environmental Microbiology**, v.4(4), p.216-224, 2002.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br>
- MARTINEZ-DE-DRETS, G.; ARIAS, A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. **Journal of Bacteriology**, v.109, p.467-470, 1972.
- MATTOS-CUZCANO, G.; ORMEÑO-ORILLO, E.; ZUÑIGA-DÁVILA D. Diversidad de los rizobios que nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) la costa central del Peru. **Ecologia**, v.01, p.47-51, 1998.
- MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura. Disponível em: http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_060701.htm, 2001.
- MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*, **Plant Cell Physiology**, v.30, p.877-884, 1989.
- MULONGOY, K.; ELKAN, G. Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen fixing efficiency. **Journal of Bacteriology**, v.13, p.179-187, 1977a.
- MULONGOY, K.; ELKAN, G. The role of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.23, p.1293-1298, 1977b.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

- NCBI (GenBank do National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- NOVORADOVSKAYA, N. *et al.*, Universal reference RNA as a standard for microarray experiments. **BMC Genomics**, v.5, 13 p., 2004.
- OKE, V.; LONG, S.R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.641-646, 1999.
- PAAU, A.S.; BLOCH, C.B.; BRILL, W.J. Development fate of *Rhizobium meliloti* bacterioids in alfafa nodules. **Journal of Bacteriology**, v.143, p.1480-1490, 1980.
- PANIZZI, M.C. e MANDARINO, J.M.G. (1994). **Soybean for human consumption: nutritional quality, processing and utilization**, p.241-254. In: Tropical Soybean: improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series, n. 27, FAO press, Roma Itália.
- PAO, G.M.; SAIER, J.R.M.H. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.40, p.136-154, 1995.
- PAVAN, C.; FILHO, C.A.M. Agronomia e biodiversidade. Bactérias fixadoras de nitrogênio na agronomia e na biodiversidade. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.4. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>, 1997.
- PERRET, X; STAEHELIN, C.; BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.
- PHILLIPS, D.A.; SANDLE, E.S.; VRIEZEN, J.A.C.; deBRUIJN, F.J., LeRUDULIER, D.; JOSEPH, C.M. A new genetic locus in *Sinorhizobium meliloti* is involved in stachydrine utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3953-3960, 1998.
- PRADO, A.L. (2004). **Hibridização DNA-DNA e expressão de genes simbióticos de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* através de "DNA Microarrays"**. 90 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- QUACKENBUSH, J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genetics Supplement**, v.32, p.496-501, 2002.
- RAJEEVAN, M.S.; VERNON, S.D.; TAYSAVANG N. UNGER E.R. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, v.13, p.26-31, 2001.
- RHIZOBASE (The Genome Database for Rhizobia). Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>.
- ROSSBACH, S. e HENNECKE, H. (1991). Identification of *glyA* as a symbiotically essential gene in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Microbiology**, v.5, p.39-47.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4371-4373, 1993.
- SALMINEN, S.O.; STREETER, J.G. Factors contributing to the accumulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerobic conditions. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.2119-2126, 1990.
- SALMINEN, S.O.; STREETER, J.G. Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with $^{14}\text{CO}_2$. **Plant Physiology**, v.100, p.597-604, 1992.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SCHENA, M.; DAVIS, R.W. **Genes, genomes and chips**. In *DNA Microarrays: A Practical Approach* (ed. M. Schena), Oxford University Press, 1999.
- SCHWEDOCK, J.S.; LIU, C.; LEYH, T.S.; LONG, S.R. *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ forma a multifuncional sulfate-activating complex requiring GTP for activity. **Journal of Bacteriology**, v.176(22), p.7055-7064, 1994.
- SHATTERS, R.G.; SOMERVILLE, J.E.; KAHN, M.L. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. **Journal of Bacteriology**, V.171(9), P.5087-5094, 1989.

- STERRENBURG, E.; TURK, R.; BOER, J.M.; VAN OMMEN, G.B.; DEN DUNNEN, J.T.
A common reference for cDNA microarray hybridizations. **Nucleic Acids Research**, v.30, 6 p., 2002.
- STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDREAU P.N. Two-component signal transduction.
Annual Review of Biochemistry, v.69, p.183-215, 2000
- STREIT, W.R., SCHMITZ, R.A., PERRET, X., STAEHELIN, C., DEAKIN, W.J.,
RAASCH, C., LIESEGANG, H. e BROUGHTON, W.J. An evolutionary hot spot: the
pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**,
v.186(2), p.535-542, 2004
- SURPIN, M.A.; MOSHIRI, F.; MURPHY, A.M.; MAIER, R.J. Genetic evidence for a
fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. **Gene**, v.27, p.73-77, 1994.
- SUTHERLAND, I.W. Bacterial surface polysaccharides structure and function.
International Review of Cytology, v.113, p.187-231, 1988.
- TAO; H.; BAUSCH, C.; RICHMOND, C.; BLATTNER, F.R.; CONWAY, T. Functional
genomics: Analysis of *Escherichia coli* growing o minimal and rich media. **Journal
of Bacteriology**, v.181, p.6425-6440, 1999.
- TATÉ, R.; RICCIO, A.; CAPUTO, E.; CERMOLA, M.; FAVRE, R.; PATRIARCA, E.J. The
Rhizobium etli trpB gene is essential for a effective symbiotic interaction with
Phaseolus vulgaris. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.926-933,
1999.
- THÖNI, B.; HENNECKE, H. The -24/-12 promoter comes of age. **FEMS Microbiology
Reviews**, v.63, p.341-358, 1989.
- TOMBOLINI, R.; BUSON, S.; SQUARTINI, A.; NUTI, M.P. Poly-beta-hydroxybutyrate
(PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti*-41. **Microbiology**, v.141, p.2553-
2559, 1995.
- TROPEL, D.; VAN DER MEER, J.R. Bacterial transcriptional regulators for degradation
pathways of aromatic compounds. **Microbiology and Molecular Biology
Reviews**, v. 68, p.474-500, 2004.

- TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v.98, p.5116-5121, 2001.
- UCHIUMI, T. et al. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.2439-2448, 2004.
- URENHA, L.C.; PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; BONOMI, A. **Produção de biomassa celular de Rizóbio**. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S.R. (Ed). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA, p.95-137, 1994.
- VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, v.59, p.124-142, 1995.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.D.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja. **Comunicado Técnico: EMBRAPA-CPAC**, Planaltina, v. 62, 3p., 1992.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I. de C.; PERES, J.R.R. Soja. In: VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I. de C.; PERES, J.R.R. (Eds.). **Fixação biológica de nitrogênio em solos de cerrados**. Brasília: Embrapa-CPAC/SPI, 1994. p.15-38.
- VASSE, J.; DE BILLY, F.; CAMUT, S.; TRUCHET, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacterioids and nitrogen fixation in alfafa nodules. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.4295-4306, 1990.
- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, p.484-487, 1995.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 200p., 1970.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S.S.; CHENG, R.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.4965-70, 1992.
- YANG, Y.H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D.M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T.P. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing

single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v.30(4): e15, 2002.

YEO, R.W.; WANG, T.; BEDZYK, L.; CROKER, K.M. Applications of DNA microarrays in microbial systems. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, p.257-272, 2001.

YU, X.; TRAN, A.H.; SUN, Q.; MARGOLIN, W. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal target domain. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1296-1304, 1998.

ZECHIEDRICH, E.L.; KHODURSKY, A.B.; BACHELLIER, S.; SCHNEIDER, R.; CHEN, D.; LILLEY, D.M.J.; COZZARELLI, N.R. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.8103-8113, 2000.

ZINN, K.; DeMAIO, D.; MANIATIS, T. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. **Cell**, v.34, p.865, 1983.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela MS1: Genes diferencialmente expressos, para os diferentes grupos funcionais, mostrando taxas de expressão significantes para bactéria cultivada em meio TY (valores positivos) ou em meio RDM (valores negativos). Expressão = $\log_2$ (TY/RDM).

Biossíntese de aminoácidos / Aparato de tradução / Funções regulatórias					
Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Amino acid biosynthesis					
<i>Aspartate family</i>	blr6298	7e-22	lag	probable asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (<i>asnB</i>)	0,65
<i>Aspartate family</i>	blr6299	2e-20		probable asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (<i>asnB</i>)	-0,79
<i>Aspartate family</i>	blI5902	8e-22	log	threonine dehydratase	1,26
<i>Aspartate family</i>	blI7862	1e-89		putative homoserine O-acetyltransferase	-0,64
<i>Branched chain family</i>	blI6037	4e-59		probable SgaA serine-glyoxylate aminotransferase	-0,61
<i>Aromatic amino acid family</i>	blr0650	4e-87	estac	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase(<i>hisB</i>)	0,94
Regulatory functions					
	blr4281	1e-69	lag	transcriptional regulatory	1,14
	blI5328	3e-77		two-component hybrid sensor and regulator	0,96
	blr5832	4e-25		transcriptional regulatory protein MarR family	0,67
	blr7984	2e-70		transcriptional regulatory protein TetR family	-0,62
	blr1847	3e-54		VirK protein homolog	-0,76
	blr4002	4e-22	log	transcriptional regulatory protein	0,89
	blI3466	2e-80		transcriptional regulatory protein Crp family	0,70
	blI2814	1e-48		transcriptional regulatory protein	-0,59
	blr3467	4e-04		two-component response regulator	-0,65
	blr7678	7e-90		transcriptional regulatory protein AraC family	-0,69
	blI0790	4e-61		probable transcriptional regulator	-0,73
	blr5548	2e-29		transcriptional regulatory protein LysR family	-0,81
	blI3466	2e-80	estac	transcriptional regulatory protein Crp family	1,41
	blr1163	7e-76		transcriptional regulatory protein MarR family	1,37
	blr1096	4e-46		phosphate regulon, two-component response regulator (<i>phoB</i>)	1,00
	blI0904	2e-16		two-component response regulator (<i>regR</i>)	0,96
	blI2814	4e-35		transcriptional regulatory protein AsnC family	0,89
	blr4002	4e-22		transcriptional regulatory protein AraC family	0,78

	blr8099	1e-63		GTP-binding protein	0,78
Translation					
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and Trna modification</i>	blr3790	3e-53	lag	cysteinyI-tRNA synthetase (<i>cysS</i>)	-0,87
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and Trna modification</i>	blr0627	e-106	log	leucyl-tRNA synthetase (<i>leuS</i>)	-0,68
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and tRNA modification</i>	blr1133	7e-37		lysyl-tRNA synthetase (<i>lysS</i>)	-0,69
<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blr6589	2e-81		aminopeptidase P	-0,70
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and Trna modification</i>	blI5087	2e-92	estac	glutamyl-tRNA (amidotransferase)	0,95
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and Trna modification</i>	blr1133	7e-37		lysyl-tRNA synthetase (<i>lysS</i>)	0,89
<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blr3130	3e-37		serine protease DO-like precursor	0,88
<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blI5368	1e-92		serine protease	-0,69
Other categories					
<i>Other</i>	blI0916	e-104	log	bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (<i>glnD</i>)	-0,62

Biossíntese de nucleotídeos / Replicação do DNA / Divisão celular

Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides					
<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr4125	3e-86	lag	5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase (<i>garS</i>)	-0,86
<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blI4102	5e-71		rRNA-adenine N6,N6-dimethyltransferase (<i>ksgA</i>)	-0,96
<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr7256	7e-57	log	putative adenylate cyclase	-0,93
<i>Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis</i>	blI4805	3e-70		CTP synthase (<i>pyrG</i>)	0,66
<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr7737	1e-89	estac	putative adenylate cyclase	0,92
<i>Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr7371	4e-10		carbamoylphosphate synthase small chain (<i>carA</i>)	1,07
	blI4805	3e-70		CTP synthase(<i>pyrG</i>)	1,06
DNA replication, recombination, and repair					
	blI0572	8e-33	lag	putative DNA topoisomerase I	0,67
	blI0875	6e-77		recombinase	-0,97
	blr5111	1e-60	log	DNA topoisomerase I (<i>topA</i>)	-0,63
	blI4696	1e-62		DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>)	-0,67
	blI5057	3e-98		topoisomerase II (<i>gyrA</i>)	-1,14
	blI0572	8e-33	estac	putative DNA topoisomerase I	0,93

Cellular processes

<i>Cell division</i>	blr0616	1e-54	lag	cell division protein (ftsK)	0,89
----------------------	---------	-------	-----	------------------------------	------

Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores / Proteínas de transporte e ligação / Processos Celulares

Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers					
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blr3257	5e-60	lag	cobalamin biosynthesis protein(<i>cobD</i>)	-0,87
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blI7942	e-119	log	probable 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase (<i>pcaB</i>)	0,82
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blI7086	5e-41		anaerobic coproporphyrinogen III oxidase (<i>hemN</i>)	0,79
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blI2399	4e-52		uroporphyrinogen decarboxylase (<i>hemE</i>)	-0,65
<i>Nicotinate and nicotinamide</i>	blr0430	6e-69		nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (<i>nadD</i>)	0,60
<i>Thiamine</i>	blr6658	1e-53		thiamine-phosphate pyrophosphorylase (<i>thiE</i>)	0,90
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blI7086	5e-41	estac	anaerobic coproporphyrinogen III oxidase (<i>hemN</i>)	1,68
<i>Nicotinate and nicotinamide</i>	blr0430	6e-69		nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (<i>nadD</i>)	1,21
<i>Thioredoxin, glutaredoxin, and glutathione</i>	blr2404	9e-48		probable gamma-glutamyltranspeptidase precursor (<i>ggf</i>)	0,77
Transport and binding proteins					
	blI3383	5e-31	lag	ABC transporter permease protein	1,19
	blI5251	1e-06		putative transporter transmembrane protein	0,72
	blr5151	2e-98		hypothetical transport protein	0,61
	blr1485	2e-98		sulfate ABC transporter ATP-binding protein	-0,63
	blr4512	9e-94		probable ABC transporter permease protein	-0,80
	blr1452	1e-52		ABC transporter ATP-binding protein	-0,85
	blI8038	9e-60		putative manganese transport protein	-0,86
	blr4512	9e-94		probable ABC transporter permease protein	-0,87
	blr5671	4e-29		ABC transporter permease protein	-0,98
	blI3875	2e-30	log	hypothetical metabolite transport protein	0,66
	blr0971	3e-35		ABC transporter ATP-binding protein	0,60
	blr3104	8e-60		major facilitator superfamily transporter	-0,60
	blI0731	6e-94		glycerol-3-phosphate ABC transporter membrane spanning protein	-0,63

blr4039	7e-81		ABC transporter substrate-binding protein	-0,64
blr4115	2e-98		putative symporter	-0,67
blr3904	2e-92		probable iron transport protein	-0,69
blr5671	4e-29		ABC transporter permease protein	-0,74
blr1891	e-116		ABC transporter permease protein	-0,75
blI3739	1e-50		probable Na ⁺ /H ⁺ antiporter	-0,78
blr3099	2e-84		ABC transporter ATP-binding protein	-0,82
blr0608	3e-26		similar to ammonium transporter	-0,83
blI1210	3e-24		ABC transporter permease protein	-0,87
blr1485	2e-98		sulfate ABC transporter ATP-binding protein	-0,89
blr3568	e-110	estac	ABC transporter permease protein	1,24
blI6064	1e-55		ABC transporter ATP-binding protein	1,20
blr4449	2e-75		amino acid ABC transporter ATP-binding protein	1,13
blI6293	1e-18		HlyB/MsbA family ABC transporter	1,08
blI1193	e-100		integral inner membrane metabolite transport protein (<i>mtbA</i>)	0,85
blI3875	3e-58		hypothetical metabolite transport protein	0,78
blr4115	1e-59		putative symporter	0,72
blr7823	4e-57		ABC transporter ATP-binding protein	-0,66
blI7341	2e-33		RhtB family transporter (')	-0,56

Cellular processes

<i>Chemotaxis</i>	blI0096	1e-47	lag	putative methyl accepting chemotaxis protein	0,80
<i>Plasmid transfer</i>	blI8285	5e-81		probable conjugal transfer protein (<i>trbE</i>)	-1,01
<i>Protein and peptide secretion</i>	blr7482	4e-38	log	putative lipoprotein signal peptidase	1.04
<i>Chaperones</i>	blI5480	5e-61	estac.	putative chaperone	0,97
<i>Plasmid transfer</i>	blI8285	5e-81		probable conjugal transfer protein(<i>trbE</i>)	1,01

Metabolismo intermediário central / Metabolismo energético / Metabolismo de ácidos graxos, fosfolipídeos e esterol / Envelope celular

Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Central intermediary metabolism					
<i>Polysaccharides and glycoproteins</i>	blr6768	2e-81	lag	glycogen branching enzyme (<i>glgB</i>)	-0,99
<i>Other</i>	blI2065	8e-70		carbonic anhydrase (<i>icfA</i>)	-0,85

<i>Other</i>	blI7271	6e-92		carbon monoxide dehydrogenase large chain	-1,11
<i>Nitrogen metabolism</i>	blI0199	5e-61	log	probable nitrile hydratase regulator	-0,62
<i>Nitrogen metabolism</i>	blr2806	2e-44		nitrite extrusion protein	-0,64
<i>Nitrogen metabolism</i>	blr0725	2e-65		nitrogen regulatory IIA protein (<i>ptsN</i>)	-0,76
<i>Nitrogen metabolism</i>	bsr1750	7e-40		ferredoxin (<i>fer3</i>)	-0,85
Energy metabolism					
<i>Respiration</i>	blr3728	1e-63	lag	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit	1,17
<i>Respiration</i>	blr0150	e-143		cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I (<i>cyoB</i>)	1,15
<i>Respiration</i>	blI3782	1e-61		cytochrome C oxidase (<i>coxP</i>)	-0,85
<i>Respiration</i>	blI4911	1e-71		NADH ubiquinone oxidoreductase chain G(<i>nuoG</i>)	-0,97
<i>Other</i>	blr2586	2e-55		ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit (<i>cbbS</i>)	-0,70
<i>Pyruvate and acetyl-CoA metabolism</i>	blI8141	e-113	log	phosphoenolpyruvate carboxykinase (<i>pckA</i>)	-0,65
<i>Pyruvate and acetyl-CoA metabolism</i>	blr4655	8e-78		Phosphoenolpyruvate synthase (<i>ppsA</i>)	-0,74
<i>Pyruvate and acetyl-CoA metabolism</i>	blr3958	e-121		putative acetyl-coenzyme A synthetase	-1,00
<i>Pyruvate dehydrogenase</i>	blI4782	2e-80		pyruvate dehydrogenase beta subunit (<i>pdhB</i>)	-0,64
<i>Other</i>	blr2583	1e-83		transketolase (<i>cbbT</i>)	-0,74
<i>Glycolysis</i>	blr6760	4e-72	estac	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (<i>zwf</i>)	1,10
<i>Sugars</i>	blI0322	2e-85		probable trehalose-6-phosphate synthase (<i>otsA</i>)	1,05
<i>Sugars</i>	blI0323	2e-47		probable trehalose-phosphatase (<i>otsB</i>)	0,95
<i>Sugars</i>	blI5920	4e-59		UDP-glucuronic acid epimerase (<i>ispL</i>)	0,93
<i>Respiration</i>	blI2210	1e-97		multicopper oxidase (<i>copA</i>)	1,13
Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism					
	blr2947	3e-46	lag	probable acyl-CoA dehydrogenase	1,19
	blI6043	4e-82		enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	0,91
	blI3855	2e-72		putative acyl-CoA dehydrogenase	-0,67
	blr0604	e-108		acyl-CoA thioesterase II (<i>tesB</i>)	-0,69
	blr1159	8e-47		acyl-CoA thiolase	-0,73
	blI6363	1e-68	log	putative acyl-CoA dehydrogenase	0,81
	blI4711	6e-53		fatty acid CoA ligase	0,81
	blr1046	8e-30		long-chain-fatty-acid-CoA ligase	-0,59
	blr5668	7e-69		B-ketoadipate enol-lactone hydrolase (<i>pcaD</i>)	-0,61

blr1021	3e-40		putative acyl-CoA dehydrogenase	-0,61
blI7864	9e-12		putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	-0,63
blI7928	7e-35		putative fatty-acid--CoA ligase	-0,72
blr3955	1e-30	estac	acyl-CoA dehydrogenase	1,26
blr0981	3e-42		acyl-CoA dehydrogenase	1,23
blI2948	e-100		putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	0,79
blr0139	e-123		putative acyl-CoA dehydrogenase	-0,54

Cell envelope*Membranes, lipoproteins and porins*

blI6516	8e-47	lag	putative transmembrane protein	-0,66
---------	-------	-----	--------------------------------	-------

Murein sacculus and peptidoglycan

blr3745	8e-99	estac.	periplasmic mannitol-binding protein	1,03
---------	-------	--------	--------------------------------------	------

Genes relacionados a simbiose e fixação do nitrogênio, relacionados a condições microaeróbicas, induzidos *in vitro*

Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Central intermediary metabolism					
<i>Nitrogen fixation</i>	blr7496	1e-34	lag	nitrogen fixation protein	0,89
<i>Nitrogen fixation</i>	blr1770	3e-45	log	molybdenum processing protein (<i>nifQ</i>)	0,74
<i>Nitrogen fixation</i>	blr2763	8e-67		cytochrome-c oxidase (<i>fixN</i>)	-0,67
<i>Nitrogen fixation</i>	blr1756	2e-44	estac	nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein (<i>nifS</i>)	0,91
<i>Nitrogen fixation</i>	blr1756	2e-44		nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein(<i>nifS</i>)	-0,63
<i>Other</i>	blI6933	1e-28		HupK protein (<i>hupK</i>)	0,88
Cellular processes					
<i>Detoxification</i>	blI7774	9e-95	lag	superoxide dismutase	1,13
<i>Detoxification</i>	blr0778	7e-78	estac	catalase	1,14
Other categories					
<i>Symbiosis</i>	blr2025	2e-73	lag	acyl transferase (<i>nodA</i>)	1,00
<i>Symbiosis</i>	blI1631	5e-90	log	GDP-mannose 4,6-dehydratase (<i>noeL</i>)	-0,68
<i>Symbiosis</i>	blr3959	1e-72		nodulation protein N (<i>nodN</i>)	-1,00

Outras categorias / Genes hipotéticos

Grupo funcional	ID	e-value	Fase	Gene (Produto gênico)	Expressão
Other categories					
<i>Drug and analog sensitivity</i>	blr6569	2e-45	<u>lag</u>	MFS permease	0,91
<i>Transposon-related functions</i>	blr1707	e-104		putative transposase	-0,78
	blr1915	2e-49		probable reverse transcriptase/maturase family protein	-0,82
	blr0023	e-130		putative transposase	-0,85
	blr8220	2e-51		putative transposase	-1,21
<i>Other</i>	bll3065	3e-57		hypothetical aldolase class II protein	1,64
	bll1317	2e-49		peroxiredoxin	0,79
	blr1409	8e-99		probable dehydrogenase	-0,64
	bll7989	6e-75		S-adenosylmethionine synthetase (<i>mat</i>)	-0,76
	blr67391	2e-59		probable pyrroloquinoline quinone synthesis protein E (<i>pqqE</i>)	-0,86
	blr3295	5e-54		D-hydantoinase	-1,03
<i>Drug and analog sensitivity</i>	bll3903	5e-67	<u>log</u>	putative multidrug resistance protein	-0,79
<i>Transposon-related functions</i>	bsl1937	4e-30		putative transposase	0,92
	blr8220	2e-51		putative transposase	-1,24
<i>Other</i>	bll2737	2e-35		oxidoreductase with iron-sulfur subunit	0,89
	blr7885	2e-93		oxidoreductase	0,74
	blr3392	4e-07		dehydrogenase	0,67
	blr1409	8e-99		probable dehydrogenase	-0,76
	bll2568	1e-54		probable acetyltransferase	-0,76
	bll1531	2e-16		probable oxidoreductase	-0,86
	bll5442	e-116		putative oxidoreductase	-0,96
	bll4101	4e-36		putative NAD-dependent alcohol dehydrogenase	-1,35
<i>Transposon-related functions</i>	bll1545	1e-39	<u>estac.</u>	putative transposase	1,24
	bsl1937	4e-30		putative transposase	0,90
<i>Other</i>	bll3369	9e-11		putative gluconolactonase	1,21
	blr6611	2e-62		amidase	1,07
	bll7886	3e-64		probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	0,99
	bll7898	2e-09		alcohol dehydrogenase	0,96
	bll4800	6e-24		2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (<i>kdsA</i>)	0,84
	bll2434	5e-14		plasmid stability protein	0,75

Hypothetical

<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr0767	6e-46	lag	hypothetical protein	1.12
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr5134	3e-77		hypothetical protein	0.98
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI6068	1e-39		hypothetical protein	0.79
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr3926	e-111		hypothetical protein	0.64
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI4295	6e-21		hypothetical protein	-0.94
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1084	4e-07		hypothetical protein	-0.89
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI3837	5e-54		hypothetical protein	-0.88
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1931	1e-40		hypothetical protein	-0.62
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI0793	4e-60	log	hypothetical protein	1.17
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr0642	2e-49		hypothetical protein	0.95
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI4742	7e-73		hypothetical protein	0.73
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2889	2e-32		hypothetical protein	0,70
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI6764	1e-78		hypothetical protein	0,60
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI0351	e-116		hypothetical protein	-0.91
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr6139	5e-60		hypothetical protein	-0.93
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2058	7e-62		hypothetical protein	-0.83
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2426	e-110		hypothetical protein	-0.81
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr7909	3e-60		hypothetical protein	-0.77
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4495	1e-41		hypothetical protein	-0.73
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI4485	1e-75		hypothetical protein	-0.73
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr0422	3e-59		hypothetical protein	-0.68
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr7623	2e-49		hypothetical protein	-0.66
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI6474	4e-74		hypothetical protein	-0.65
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI3837	5e-54		hypothetical protein	-0.64
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2487	1e-04		hypothetical protein	-0.63
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI7083	3e-57		hypothetical protein	-0.61
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4478	2e-47		hypothetical protein	-0.61
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4890	1e-37		hypothetical protein	-0.61
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr8037	e-108		hypothetical protein	-0,60
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr6216	3e-54	estac.	hypothetical protein	1.26
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1934	1e-80		hypothetical protein	1.25

Conserved hypothetical protein	blr2889	2e-32	hypothetical protein	1.24
Conserved hypothetical protein	blr1931	1e-75	hypothetical protein	1,20
Conserved hypothetical protein	blr8130	2e-69	hypothetical protein	1.11
Conserved hypothetical protein	blr2083	8e-86	hypothetical protein	1.03
Conserved hypothetical protein	blI8257	e-123	hypothetical protein	0.98
Conserved hypothetical protein	blI1129	4e-24	hypothetical protein	0.97
Conserved hypothetical protein	blr4409	e-113	hypothetical protein	0.96
Conserved hypothetical protein	blI1142	4e-95	hypothetical protein	0.96
Conserved hypothetical protein	blr0479	2e-45	hypothetical protein	0.91
Conserved hypothetical protein	blI0702	2e-97	hypothetical protein	0.91
Conserved hypothetical protein	blI5621	3e-59	hypothetical protein	0,79

Tabela MS2: Genes diferencialmente expressos, para os diferentes grupos funcionais, mostrando taxas de expressão significantes para bacterióides em diferentes estágios de desenvolvimento da simbiose nodular.

Expressão = $\log_2$ (Bacterióide/Bactéria YMB).

13 D.A.I. (Dias Após Inoculação)				
Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Amino acid biosynthesis				
Branched chain family	blI0414	6e-57	3-isopropylmalate dehydrogenase(<i>leuB</i>)	2.25
Serine family / Sulfur assimilation	blI4682	2e-48	cysteine synthase (<i>cysK</i>)	1.19
Aspartate family	blr0685	7e-87	dihydrodipicolinate reductase (<i>dapB</i>)	2.57
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers				
Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin	blI7076	1e-74	Hemin receptor precursor (<i>hmuR</i>)	1.16
Cell envelope				
Murein sacculus and peptidoglycan	blr1314	3e-82	penicillin tolerance protein	1.19
Cellular processes				

<i>Cell division</i>	blI6596	1e-56	cell division protein (<i>ftsZ</i>)	2.26
<i>Detoxification</i>	blI7497	1e-40	putative haloacetate dehalogenase (EC 3.8.1.3)	1.58
<i>Detoxification</i>	blI7774	9e-95	superoxide dismutase (<i>sodF</i>)	1.12
Central intermediary metabolism				
<i>Nitrogen fixation</i>	blr4342	9e-19	aminotransferase (<i>nifS</i>)	1.42
<i>Nitrogen fixation</i>	blI4612	6e-29	putative beta (1-6) glucans synthase (<i>ndvC</i>)	1.09
Energy metabolism				
<i>TCA cycle</i>	blI3137	8e-65	NADH dehydrogenase I chain F (<i>nuoF</i>)	1.04
Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism				
	blI5335	5e-91	blI5335 putative thiolase 5e-91	5.11
	blr0982	blr1e-39	blr0982 acyl-CoA dehydrogenase 1e-39	1.70
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides				
<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr2264	6e-41	blr2264 putative adenylate cyclase 6e-41	1.02
Regulatory functions				
	blr4466	1e-28	transcriptional regulatory protein AraC family	1.88
	blr8150	e-126	GTP-binding elongation factor (<i>lepA</i>)	1.38
	blI1199	2e-94	two-component hybrid sensor and regulator	1.97
DNA replication, recombination, and repair				
	blI1144	2e-50	putative ATP dependent DNA ligase	2.09
	blr5111	1e-60	DNA topoisomerase I (<i>topA</i>)	1.48
	blI0823	8e-73	DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>)	1.27
Transcription				
<i>RNA synthesis, modification, and DNA transcription</i>	blI0752	4e-08	putative helicase 2	1.44
<i>RNA synthesis, modification, and DNA transcription</i>	blI1447	2e-34	dead-box ATP-dependent RNA helicase (<i>rhIE</i>)	1.05

Translation

<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blI5153	e-116	ClpA-like protein	1.60
---	---------	-------	-------------------	------

Transport and binding proteins

blI0700	1e-22	heavy-metal transporting P-type ATPase	1.38
blr3357	5e-13	ABC transporter ATP-binding protein	1.34
blr1357	8e-50	peptide ABC transporter ATP-binding protein	1.73

Other categories

<i>Drug and analog sensitivity</i>	blI5460	2e-24	MFS permease	1.93
<i>Symbiosis</i>	blI1475	4e-06	NodQ bifunctional enzyme (<i>nodQ</i>)	1.42
<i>Symbiosis</i>	blr3959	1e-72	nodulation protein N (<i>nodN</i>)	1.40
<i>Other</i>	blI0065	6e-34	putative DNA-binding protein	2.30
<i>Other</i>	blr7491	2e-08	putative 2-keto-gluconate dehydrogenase	1.51
<i>Other</i>	blr6331	2e-22	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit (<i>bkdA1</i>)	1.21
<i>Other</i>	blI7010	4e-08	sulfonate monooxygenase (<i>ssuD</i>)	1.18
<i>Other</i>	blr4134	2e-15	aminotransferase	1.14

Hypothetical

<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI0702	2e-97	hypothetical protein	1.78
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI5551	2e-57	hypothetical protein	1.75
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr0911	4e-76	hypothetical protein	1.63
<i>Conserved hypothetical protein</i>	bsr1458	1e-18	hypothetical protein	1.62
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr5067	2e-29	hypothetical protein	1.51
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2544	3e-74	hypothetical protein	1.40
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI0114	5e-15	hypothetical protein	1.35
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI4295	6e-21	hypothetical protein	1.24
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI6366	2e-61	hypothetical protein	1.16
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI8152	2e-37	hypothetical protein	1.12
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1934	1e-80	hypothetical protein	1.12
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4568	2e-68	hypothetical protein	1.10
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI0912	3e-92	hypothetical protein	1.00

28 D.A.I.

Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Amino acid biosynthesis				
<i>Aspartate family</i>	blr7382	9e-94	Dihydrodipicolinate synthase (EC 4.2.1.52)	1.20
<i>Glutamate family / Nitrogen assimilation</i>	blr4835	5e-83	glutamine synthetase I (<i>glnA</i>)	1.24
<i>Aspartate family</i>	blr4967	3e-80	O-acetylhomoserine sulfhydrylase (<i>cysD</i>)	1.22
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers				
<i>Thioredoxin, glutaredoxin, and glutathione</i>	blr0594	2e-94	thioredoxin (<i>trxA</i>)	1.38
Cell envelope				
<i>Murein sacculus and peptidoglycan</i>	blr1314	3e-82	penicillin tolerance protein	1.03
Cellular processes				
<i>Detoxification</i>	blI7774	9e-95	superoxide dismutase (<i>sodF</i>)	1.61
<i>Plasmid transfer</i>	blI8282	1e-84	probable conjugal transfer protein (<i>trbL</i>)	1.63
Central intermediary metabolism				
<i>Nitrogen metabolism</i>	blr4948	4e-47	nitrogen regulatory protein PII (<i>glnB</i>)	1.10
<i>Other</i>	blr3352	2e-38	putative carbon monoxide dehydrogenase small chain	1.23
<i>Nitrogen fixation</i>	blr2763	8e-62	cytochrome-c oxidase (<i>fixN</i>)	1.32
<i>Nitrogen fixation</i>	blr1761	2e-46	iron-sulfur cofactor synthesis protein (<i>nifZ</i>)	1.19
<i>Nitrogen fixation</i>	blI1421	1e-53	prephenate dehydratase (<i>pheA</i>)	1.19
<i>Nitrogen fixation</i>	blI2623	2e-26	short-chain alcohol dehydrogenase (<i>fixR</i>)	1.12
<i>Nitrogen fixation</i>	blI4612	5e-87	putative beta (1-6) glucans synthase (<i>ndvC</i>)	1.01
Energy metabolism				
<i>TCA cycle</i>	blr0183	2e-27	citrate synthase (<i>cis</i>)	1.02
<i>Sugars</i>	blr6758	2e-97	probable transaldolase	1.19
Regulatory functions				
	blI0635	5e-90	transcription termination factor (<i>rho</i>)	1.07

	blr1163	7e-76	transcriptional regulatory protein MarR family	1.05
	blr3219	4e-78	probable transcriptional regulator	1.32
DNA replication, recombination, and repair				
	blr8131	5e-61	DNA polymerase I (<i>polA</i>)	1.42
	blr8114	9e-95	recombination protein (<i>recR</i>)	1.43
Translation				
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and tRNA modification</i>	blr5750	e-120	alanyl-tRNA synthetase (<i>alaS</i>)	1.03
Transport and binding proteins				
	blr5251	3e-68	putative transporter transmembrane protein	1.66
	blr2870	6e-54	putative transporter transmembrane protein	1.18
	blr3570	4e-20	ABC transporter ATP-binding protein	1.20
	blr5648	9e-12	nitrate ABC transporter permease protein	1.04
	blr1050	2e-93	branched chain amino acid transport system substrate binding protein	2.44
	blr3965	1e-41	probable ATP-binding protein	1.05
Other categories				
<i>Other</i>	blr6073	3e-93	probable poly-beta-hydroxybutyrate polymerase (EC 2.3.1.-) (<i>phbC</i>)	1.00
<i>Other</i>	blr2256	5e-34	hypothetical oxidoreductase	1.02
<i>Other</i>	blr4189	5e-09	putative acetyl-hydrolase	1.39
<i>Other</i>	blr6965	7e-48	putative dehalogenase	1.73
<i>Other</i>	blr6241	5e-32	urocanase (<i>hutU</i>)	1.19
<i>Symbiosis</i>	blr7861	2e-70	putative rhizopine catabolism protein	1.12
<i>Other</i>	blr8187	6e-40	dehydrogenase	1.17
<i>Hydrogenase</i>	blr6930	1e-92	hydrogenase maturation protein (<i>hypF</i>)	1.57
<i>Symbiosis</i>	blr1475	5e-96	NodQ bifunctional enzyme (<i>nodQ</i>)	1.25
Hypothetical				
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr7137	2e-66	hypothetical protein	3.77
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr5067	2e-29	hypothetical protein	1.07
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr8140	3e-48	hypothetical protein	1.15

Conserved hypothetical protein	blr7530	1e-12	hypothetical protein	1.05
Conserved hypothetical protein	blr5569	7e-64	hypothetical protein	1.75
Conserved hypothetical protein	blI1020	2e-77	hypothetical protein	1.23
Conserved hypothetical protein	blI4830	2e-37	hypothetical protein	4.38
Conserved hypothetical protein	blr7995	e-106	hypothetical protein	2.43
Conserved hypothetical protein	blI6366	2e-61	hypothetical protein	1.80

48 D.A.I.

Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Amino acid biosynthesis				
Aromatic amino acid family	blr0745	7e-16	tryptophan synthase beta subunit (<i>trpB</i>)	0.77
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers				
Thioredoxin, glutaredoxin, and glutathione	blr2404	e-104	probable gamma-glutamyltranspeptidase precursor (EC 2.3.2.2) (<i>ggt</i>)	0.60
Central intermediary metabolism				
Nitrogen fixation	blI2757	4e-72	transcriptional regulatory protein Crp family (<i>fixK2</i>)	1.07
Polysaccharides and glycoproteins	blr6459	1e-78	glycogen synthase (<i>glgA</i>)	0.67
Nitrogen fixation	blr2769	5e-07	E1-E2 type cation ATPase (<i>fixI</i>)	0.61
Nitrogen fixation	blr2763	8e-62	cytochrome-c oxidase (<i>fixN</i>)	0.85
Nitrogen metabolism	bsr1750	7e-40	ferredoxin (<i>fer3</i>)	0.58
Energy metabolism				
Pyruvate and acetyl-CoA metabolism	blI4784	5e-91	aldehyde dehydrogenase	0.66
Transcription				
RNA synthesis, modification, and DNA transcription	blI1028	2e-15	RNA polymerase sigma factor (<i>carQ</i>)	0.73
Translation				
Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides	blI5267	1e-34	propionyl-coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide (<i>pccA</i>)	0.67
Transport and binding proteins				

	blr3223	4e-45	ABC transporter permease protein	0.61
	bll6354	8e-29	ABC transporter permease protein	1.04
	blr3357	5e-13	ABC transporter ATP-binding protein	0.67
	blr1428	2e-27	ABC transporter ATP-binding protein	0.65
Other categories				
<i>Transposon-related functions</i>	blr2477	2e-10	putative transposase	0.76
<i>Other</i>	bll3375	e-114	probable dehydrogenase	0.59
<i>Other</i>	bll2678	4e-06	putative D-lactate dehydrogenase (cytochrome) protein	0.60
<i>Transposon-related functions</i>	blr8004	1e-09	probable site-specific integrase/recombinase	0.65
<i>Other</i>	blr7589	2e-52	putative oxidoreductase	1.18
<i>Other</i>	blr6611	2e-62	amidase	0.59
Hypothetical				
Conserved hypothetical protein	blr6774	2e-41	hypothetical protein	0.82
Conserved hypothetical protein	bll0796	4e-31	hypothetical protein	0.83
Conserved hypothetical protein	bll5313	4e-41	hypothetical protein	0.64
Conserved hypothetical protein	bll6809	1e-55	hypothetical protein	0.59
Conserved hypothetical protein	blr2751	1e-89	hypothetical protein	1.31
Conserved hypothetical protein	bll6366	2e-61	hypothetical protein	0.59

Tabela MS3: Genes diferencialmente expressos, para os diferentes grupos funcionais, mostrando taxas de expressão significantes para bactéria cultivada em meio YMB. Expressão = log2 (Bacterióide/Bactéria YMB).

YMB (em relação a 13 d.a.i.)				
Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Celular processes				
<i>Detoxification</i>	bll2856	1e-92	probable cytochrome P450 (EC 1.14.-.-)	-1.20
<i>Cell division</i>	bll6508	2e-92	putative hydrolase serine protease transmembrane protein	-1.21

Energy metabolism

<i>Glycolysis</i>	blr2436	2e-97	glycerol-3-phosphate dehydrogenase(<i>glpD</i>)	-1.09
-------------------	---------	-------	---	-------

Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism

	blI1319	1e-13	-chain-fatty-acid-CoA ligase (EC 6.2.1.3)(<i>fadD</i>)	-1.80
	blr3956	2e-66	enoyl-CoA hydratase	-1.04

Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides

<i>Purine ribonucleotide biosynthesis</i>	blr4264	3e-85	putative adenylate cyclase protein	-4.37
---	---------	-------	------------------------------------	-------

Regulatory functions

	blI0240	2e-24	transcriptional regulatory protein AsnC family	-1.23
	blr4255	2e-16	transcriptional regulatory protein AraC family	-1.19

DNA replication, recombination, and repair

	blI0051	2e-55	methylated-DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.63) (<i>ogt</i>)	-1.44
	blr0915	4e-54	replication protein A(<i>repA</i>)	-1.04

Transcription

<i>RNA synthesis, modification, and DNA transcription</i>	blr7812	3e-28	putative RNA polymerase sigma factor	-3.01
---	---------	-------	--------------------------------------	-------

Transport and binding proteins

	blI0700	3e-27	heavy-metal transporting P-type ATPase	-1.04
	blr6248	1e-85	ABC transporter ATP-binding protein	-1.17
	blr6648	3e-68	ABC transporter substrate-binding protein	-1.21

Other categories

<i>Transposon-related functions</i>	blI2855	e-119	ornithine aminotransferase (EC 2.6.1.13)(<i>rocD</i>)	-1.03
<i>Other</i>	blr6288	1e-09	putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (EC 1.1.1.100)	-1.14
<i>Other</i>	blr8301	2e-32	putative transposase	-1.16

Hypothetical

<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI7553	1e-36	hypothetical protein	-1.58
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1327	1e-65	hypothetical protein	-1.03
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2058	7e-62	hypothetical protein	-1.38
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2426	e-110	hypothetical protein	-1.79
<i>No similarity</i>	blr4339	e-122	unknown protein	-1.10
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4357	9e-06	hypothetical protein	-1.03
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr5306	1e-56	hypothetical protein	-1.07

YMB (em relação a 28 d.a.i.)

Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Amino acid biosynthesis				
<i>Serine family / Sulfur assimilation</i>	blI6120	6e-56	putative sulfite oxidase cytochrome subunit	-1.11
<i>Branched chain family</i>	blr4023	2e-73	putative acetolactate synthase (EC 4.1.3.18)	-1.67
Cellular processes				
<i>Plasmid transfer</i>	blI8285	5e-81	probable conjugal transfer protein(<i>trbE</i>)	-1.50
Central intermediary metabolism				
<i>Polysaccharides and glycoproteins</i>	blr8272	5e-20	probable phosphoglucomutase phosphomannomutase protein	-1.20
Energy metabolism				
<i>Sugars</i>	blI0322	2e-85	probable trehalose-6-phosphate synthase(<i>otsA</i>)	-1.30
<i>Respiration</i>	blI4480	1e-43	probable cytochrome C oxidase polypeptide I (EC 1.9.3.1)	-1.06
Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism				
	blI1319	e-114	long-chain-fatty-acid-CoA ligase (EC 6.2.1.3)(<i>fadD</i>)	-1.66
Regulatory functions				
	blI1029	7e-70	two-component response regulator	-1.26
	blr4002	4e-22	transcriptional regulatory protein AraC family	-2.18
	blr4230	8e-43	transcriptional regulatory protein TetR family	-1.42

Translation

<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blI1351	3e-90	putative serine protease	-1.87
<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blr1404	6e-78	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit(<i>clpB</i>)	-1.68

Transport and binding proteins

blI0089	1e-68	ABC transporter permease protein	-1.32
blr3815	6e-06	putative cation-transporting ATPase (EC 3.6.3.-)	-1.97

Hypothetical

<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI3055	3e-35	hypothetical protein	-1.79
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr3043	5e-33	hypothetical protein	-1.28

YMB (em relação a 48 d.a.i.)

Grupo funcional	Acesso (ID)	e-value	Gene (Produto gênico)	Expressão
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers				
<i>Cobalamin, heme, phycobilin and porphyrin</i>	blr2398	3e-27	porphobilinogen deaminase (EC 4.3.1.8)(<i>hemC</i>)	-0.64
Cellular processes				
<i>Detoxification</i>	blr7243	7e-44	putative cytochrome P450	-0.75
Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism				
	blr7844	2e-48	enoyl-CoA hydratase(<i>fad</i>)	-0.91
Regulatory functions				
	blI0687	b2e-46	transcriptional regulatory protein AraC family	-0.74
	blr7396	4e-17	two-component hybrid sensor and regulator	-0.64
Tranlation				

<i>Protein modification and translation factors</i>	blI2554	e-117	glycine cleavage system T protein, aminomethyltransferase(<i>gcvT</i>)	-0.61
<i>Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides</i>	blI4822	3e-72	carboxy-terminal protease(<i>ctpA</i>)	-1.65
<i>Aminoacyl tRNA synthetases and tRNA modification</i>	blr3229	1e-07	putative glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit (EC 6.3.5.-)	-0.59
Transport and binding proteins				
	blI3902	1e-44	AcrB/AcrD/AcrF family protein	-0.85
	blr5675	7e-52	ABC transporter substrate-binding protein	-0.80
	blr6152	2e-71	ABC transporter ATP-binding protein	-0.76
Other categories				
<i>Drug and analog sensitivity</i>	blI5360	4e-46	putative beta-lactamase precursor (EC 3.5.2.6)	-0.68
<i>Drug and analog sensitivity</i>	blr1516	6e-21	RND multidrug efflux transporter(<i>acrB</i>)	-0.62
<i>Other</i>	blr1686	2e-50	putative aminotransferase protein	-1.05
<i>Transposon-related functions</i>	blr2053	3e-54	putative transposase	-1.47
Hypothetical				
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI2237	e-110	hypothetical protein	-0.67
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blI8014	2e-75	hypothetical protein	-0.75
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr1003	6e-43	hypothetical protein	-0.63
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr2426	2e-13	hypothetical protein	-1.28
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr3822	4e-35	hypothetical protein	-0.88
<i>Conserved hypothetical protein</i>	blr4161	2e-23	hypothetical protein	-0.59

APÊNDICE

1. Composição dos meios utilizados para cultivo de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587.

YMB ("Yeast Mannitol Broth") / pH 6,8		Composição do Meio	Concentração
		K ₂ HPO ₄	500 mg/L
YMA ("Yeast Mannitol Agar") / pH 6,8		Adicionam-se 9 g/L de ágar ao meio YMB.	
		MgSO ₄ x 7H ₂ O	200 mg/L
		NaCl	100 mg/L
		Manitol	10 g/L
		Extrato de Levedura	500 mg/mL
TY ("Tryptone-Yeast Medium") / pH 7,0		Composição do Meio	Concentração
		Triptona	500 mg/mL
		Extrato de Levedura	300 mg/mL
		CaCl ₂	870 mg/mL
RDM ("Rhizobium Definied Medium") / pH 6,9		Composição do Meio	Concentração
		K ₂ HPO ₄	230 mg/mL
		MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/mL
		Glutamato Na ⁺ x 1H ₂ O	1100 mg/mL
		Glicerol	4 mL/L
Preparar na forma de estoque [1000x]. Utilizar 1 mL/L.		Elementos Traços	
		CaCl ₂	5 mg/mL
		H ₃ BO ₃	145 mg/mL
		FeSO ₄ x 7H ₂ O	125 mg/mL
		CoSO ₄ x 7H ₂ O	70 mg/mL
		CuSO ₄ x 7H ₂ O	5 mg/mL
		MnCl ₂ x 4H ₂ O	4,3 mg/mL
		ZnSO ₄ x 7H ₂ O	108 mg/mL
		NaMoO ₄	125 mg/mL
Preparar na forma de estoque [1000x] em 0,05M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0. Utilizar 1 mL/L.		Vitaminas	
		Riboflavina	0,02 mg/mL
		Ácido P-Aminobenzoico	0,02 mg/mL
		Ácido Nicotínico	0,02 mg/mL
		Biotina	0,02 mg/mL
		Tiamina-HCl	0,02 mg/mL
		Piridoxina-HCl	0,02 mg/mL
		Pantotenato de Ca ²⁺	0,02 mg/mL
		Inositol	0,12 mg/mL

2. Composição da solução nutritiva isenta de nitrogênio, para plantas de soja.

Solução Nutritiva de Gibson / pH 6,8	
Composição	Concentração
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	160 mg/L
$MgSO_4 \times 7H_2O$	110 mg/L
$CaCl_2 \times 2H_2O$	7,5 mg/L
KCl	110 mg/L
$FeCl_3$	8 g/L
Micronutrientes	1 mL/L da solução estoque [1000x]
Estoque de Micronutrientes	
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnSO_4 \times 1H_2O$	2,08 g/L
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,22 g/L
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,08 g/L
$NaMoO_4$	0,11 g/L
$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,0073 g/L

3. Meio utilizados para transformação de células competentes, *Escherichia coli*.

Meio LB (Luria e Bertani) / pH 7,0	
Composição	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Meio sólido	Adicionam-se 9 g/L de ágar ao meio
Meio SOB / pH 7,0	
Composição	Concentração
Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KCL 250 mM	10 mL/L
$MgCl_2$ 1M	10 mL/L
Meio SOC / pH 7,0	
Meio SOB enriquecido com 20 mM de glicose	

4. Linhagem de *E. coli* utilizada como hospedeiro.

Foi utilizada a linhagem DH5 α F⁻ [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*], sensível a ampicilina (Ap). Corresponde a uma linhagem supressiva deficiente em recombinação. ϕ 80 *lacZ* Δ M15 permite a α complementação com o N-terminal da β -galactosidase codificada pelo vetor (Sambrook, 1989).

5. Controles negativos empregados no microarranjo de DNA Be587.

Os controles experimentais negativos são originários do laboratório do Dr. Rangasamy Periyannan Elumalai (Universidade do Arizona, USA):

- pHUM1 e pHUM7 (gene humano, usado como RT), inseridos no plasmídeo pT3T7. A amplificação destes insertos foi realizada com os iniciadores “forward” T7 (aat acg act cac tat ag) e “reverse” T3 (taa ccc tca cta aag gga).
- 605077A07 (fator de elongação 1A) e 605028B02 (Tubulina α), inseridos no plasmídeo pAD-GAL4-2.1. A amplificação destes insertos foi realizada com os iniciadores “forward” T7 (aat acg act cac tat ag) e “reverse” (cta ttc gat gat gaa gat acc).
- 707050B11 (subunidade menor da Rubisco), inserido no plasmídeo pGAD10Os. Amplificado com a seguinte sequência dos oligonucleotídeos: gtg aac ttg cgg ggt ttt tca (“forward”) e cta ttc gat gat gaa gat acc (“reverse”).

Foi realizada a amplificação por PCR com 100 μ L de volume final contendo 60 ng de DNA, 200 μ M dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase, 3 pmoles de cada oligonucleotídeo, tampão de PCR (1x) e 2 mM de MgCl₂. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando-se o seguinte programa de amplificação: Um ciclo inicial de 94°C por 2 min, 35 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min) e um ciclo final a 72°C por 10 min.

6. Lista das quinze categorias de grupos funcionais de acordo com RhizoBase.

#	Categoria
1	Biossíntese de aminoácidos <i>[aminoácidos aromáticos; aspartato; aminoácidos de cadeia ramificada; glutamato (assimilação de nitrogênio); serina (assimilação de enxofre)]</i>
2	Biossíntese de Cofatores, Grupos Prostéticos e Carreadores <i>(biotina; carotenóide; cobalamina, grupo heme, ficobilina e porfirina; ácido fólico; lipoato; menaquinona e ubiquinona; molibdopterina; nicotinato e nicotinamida; pantotenato; piridoxina; quinolinato; riboflavina; tiamina; tiredoxina, glutaredoxina e glutatona)</i>
3	Envelope Celular <i>(membranas, lipoproteínas e porinas; mureína e peptidoglicano; polissacarídeos de superfície, lipolissacarídeos e antígenos; estruturas de superfície)</i>
4	Processos Celulares <i>(divisão celular; morte celular; chaperoninas; quimiotaxia; destoxificação; secreção de proteínas e peptídeos; transformação; transferências de plasmídeos)</i>
5	Metabolismo Intermediário Central <i>(açúcares aminados; compostos fosfóricos; fixação de nitrogênio; metabolismo do nitrogênio; polissacarídeos e glicoproteínas)</i>
6	Metabolismo Energético <i>(Aminoácidos e aminas; via do glicolato; glicólise; vias da pentose-fosfato; metabolismo do piruvato e acetil-CoA; açúcares, ciclo do ácido tricarboxílico; respiração)</i>
7	Metabolismo de Ácidos Graxos, Fosfolipídeos e Esterol
8	Purinas, Pirimidinas, Nucleosídeos e Nucleotídeos <i>(interconversões e "salvage" de nucleosídeos e nucleotídeos; biossíntese de purinas e pirimidinas ribonucleotídicas)</i>
9	Funções de Regulação
10	Replicação, Recombinação e Reparo de DNA
11	Transcrição <i>(degradação de RNA; síntese de RNA, modificação e transcrição de DNA)</i>
12	Tradução <i>(tRNA aminoacil sintetases e modificação de tRNA; proteínas ribossomais, degradação de proteínas, peptídeos e glicoproteínas; nucleoproteínas; modificação protéica e fatores de tradução)</i>
13	Transporte e Proteínas de Ligação
14	Outras Categorias <i>(adaptações e condições atípicas; sensibilidade à drogas e análogos; sensibilidade à radiação; proteínas de "WD-repeat" (repetição de triptofano e aspartato); hidrogenase; transposons; simbiose)</i>
15	Hipotéticas <i>(proteínas hipotéticas conservadas; sem similaridade)</i>