



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Análise e Sobre-expressão de Genes de Simbiose
de Rizóbios de Grão-de-bico”**

Fernando Celso Eufigénio Eliziário

Orientação: Professora Solange Oliveira

Co-orientação: Dr^a Ana Alexandre

Mestrado em Bioquímica

Évora, fevereiro de 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

“Análise e Sobre-expressão de Genes de Simbiose de Rizóbios de Grão-de-bico”

Fernando Celso Eufigénio Eliziário

Orientação: Professora Solange Oliveira

Co-orientação: Dr^a Ana Alexandre

Mestrado em Bioquímica

Évora, fevereiro de 2016

*“Encontrei uma preta
Que estava a chorar,
Pedi-lhe uma lágrima
Para analisar.
Recolhi a lágrima
Com todo o cuidado
Num tubo de ensaio
Bem esterilizado
Olhei-a de um lado,
Do outro e de frente
Tinha um ar de gota
Muito transparente
Mandeí vir os ácidos,
As bases e os sais,
As drogas usadas
Em casos que tais.
Ensaiei a frio,
Experimentei ao lume,
De todas as vezes
Deu-me o que é costume:
Nem sinais de negro
Nem vestígios de ódio
Água (quase tudo)
E cloreto de sódio”
(António Gedeão)*

Agradecimentos

A realização desta tese não seria possível sem o apoio e a ajuda de muitas pessoas as quais gostaria de agradecer:

A toda a minha família em especial aos meus pais e à minha irmã, para além de todo o amor, apoio e força que me deram, agradeço todo o esforço e sacrifícios que fizeram e que me permitiram chegar aqui

À Professora Solange Oliveira, minha orientadora, pela oportunidade que me deu de poder realizar esta tese, pela disponibilidade e todo o apoio e confiança em mim depositados que me permitiram expandir os meus horizontes e conhecimentos.

À Dra. Ana Alexandre, minha co-orientadora, por toda a disponibilidade, por tudo o que me ensinou, pela paciência para organizar este projeto e o dobro dessa paciência para me corrigir e orientar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas Ana Paço, Clárisse Brígido e Rodrigo Silva, por todo o apoio e ajuda fornecida e por me fazerem sentir integrado no grupo de trabalho.

À D. Gertrudes Mariano, por todo o esforço e dedicação que permitem o funcionamento do laboratório.

A todo o pessoal do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade de Évora, pela simpatia e disponibilidade, acompanhadas de momentos de boa disposição.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo – ICAAM, Universidade de Évora, pela cedência do espaço e dos materiais necessários à realização deste projeto;

À Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE) do Fundo Comunitário Europeu FEDER no âmbito do Projecto "**Evolution of symbiosis genes in rhizobia: chickpea mesorhizobia as case study**" (PTDC/BIA-EVF/4158/2012) e ao Projecto InAlentejo ALENT-07-0262-FEDER-001871 pelo apoio financeiro.

À minha namorada Rita Laranjo, por todo o amor e dedicação, um dos pilares da minha vida que me permite manter a chama acesa e me faz querer ir mais e mais longe.

Resumo

Dos genes envolvidos na simbiose entre rizóbios e plantas leguminosas, destaca-se o gene *nodD*, que codifica o ativador da transcrição dos genes de nodulação. No entanto, este gene está pouco estudado em *Mesorhizobium*.

Esta tese compreende o estudo detalhado do gene *nodD* em espécies de *Mesorhizobium* noduladoras de grão-de-bico, nomeadamente a investigação da sua diversidade, e a análise do efeito da sua sobre-expressão na eficiência simbiótica. Investigou-se ainda se a sua presença seria capaz de mudar a gama de hospedeiros de um rizóbio. Obteve-se um grande aumento da eficiência simbiótica nas estirpes V-15b e ST-2, transformadas com a cópia extra de *nodD*.

Este trabalho constitui a primeira tentativa de melhorar a eficiência simbiótica de mesorizóbios através da sua transformação com um gene simbiótico, mostrando que esta é uma estratégia promissora para a obtenção de rizóbios inoculantes mais eficientes.

Palavras-chave: Sobre-expressão; Rizóbios; Genes de simbiose; gene *nodD*; *Mesorhizobium*, grão-de-bico

"Analysis and overexpression of symbiosis genes from chickpea rhizobia"

Abstract

Among the genes involved in the rhizobia-legume symbiosis, the gene *nodD* has an important role, since it encodes the major transcriptional activator of nodulation genes. However, this gene is not fully study in *Mesorhizobium*.

This thesis describes the study of the *nodD* gene from *Mesorhizobium* species that nodulate chickpea, namely the investigation of its diversity and the analysis of the effect of its overexpression in the symbiotic efficiency. In addition, it was investigated if *nodD* presence would be able to change the host range in rhizobia. A high improvement in the symbiotic efficiency of the strains V-15b and ST-2 was obtained after transformation with a *nodD* extra copy.

This report describes the first attempt to enhance the symbiotic efficiency through the transformation of mesorhizobia with a symbiosis gene, showing that this approach could be a promising strategy to obtain efficient rhizobia inoculants.

Keywords: Overexpression; Rhizobia; Symbiosis genes; *nod gene*, chickpea

Resumo Alargado

Com o aumento da necessidade de alimentos devido ao crescimento da população mundial ao longo das últimas décadas, novas técnicas de agricultura emergiram, nomeadamente a utilização de fertilizantes, pesticidas e herbicidas que se tornaram numa enorme fonte de poluição, levando à eutrofização de cursos de água, destruição de flora e fauna e afectando direta ou indiretamente a saúde humana. Com o aumento da preocupação a nível global em relação à protecção do meio ambiente, surgiu a necessidade de se reinventarem novas técnicas agrícolas. Uma das estratégias para promover formas de agricultura sustentável passa pela utilização de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas, que são bactérias presentes na rizosfera, incluindo os rizóbios, que possuem a capacidade de interagir simbioticamente com plantas leguminosas, promovendo o seu crescimento através da fixação de azoto atmosférico. O grão-de-bico (*Cicer arietinum*), uma planta leguminosa nativa do sudoeste da Turquia, ocupa atualmente o segundo lugar das leguminosas mais produzidas no mundo. No entanto, os rizóbios capazes de estabelecer simbiose com esta planta ainda não estão completamente estudados. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta simbiose pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias para melhorar o cultivo desta planta leguminosa, podendo aumentar a sua taxa de produção ou melhorando a sua tolerância a fatores de stress bióticos e abióticos.

Muitos genes estão envolvidos na simbiose entre rizóbio e a planta de grão-de-bico, nomeadamente, os genes *nif* e *fix* que estão envolvidos na formação do complexo nitrogenase que promove a fixação de azoto atmosférico, e os genes *nod*, que são responsáveis pelo processo de formação de nódulos nas raízes. Entre estes genes destaca-se o gene *nodD*, que codifica a proteína NodD, um regulador transcricional pertencente à família das LysR, responsável por mediar a interacção entre os flavonóides produzidos pela planta e a expressão do operão *nod*, pelo reconhecimento do hospedeiro, infecção das raízes e formação dos nódulos pelos rizóbios.

O principal objetivo deste projeto passa pelo estudo detalhado do gene *nodD* em espécies de *Mesorhizobium* noduladoras de grão-de-bico. Os objetivos específicos são: i) investigar a diversidade do gene *nodD* em várias estirpes de rizóbios de grão-de-bico, incluindo *Mesorhizobium ciceri* e *M. mediterraneum*; ii) investigar se a sobre-expressão do

gene *nodD* poderá levar a um aumento da eficiência simbiótica; iii) investigar se a sobre-expressão de gene *nodD* heterólogo será capaz de mudar a gama de hospedeiros de um rizóbio.

Cinco estirpes de rizóbio de grão-de-bico foram transformadas com o vector de expressão pRK415 contendo o gene *nodD* da estirpe *M. mediterraneum* Ca36. As estirpes foram caracterizadas em termos de crescimento em meio líquido, cinética de nodulação e eficiência simbiótica. A avaliação da performance simbiótica das estirpes V15b e ST2 mostrou que, apesar de não se ter obtido um aumento significativo do número de nódulos com a cópia extra do *nodD*, obteve-se um aumento da eficiência simbiótica na ordem dos 100%. Este trabalho, que constitui a primeira tentativa de melhorar a eficiência simbiótica de rizóbios com um gene simbiótico, mostra claramente que esta é uma estratégia promissora para a obtenção de rizóbios inoculantes mais eficientes.

Palavras-chave: Sobre-expressão; Rizóbios; Genes de simbiose; gene *nodD*; *Mesorhizobium*, grão-de-bico

"Analysis and overexpression of symbiosis genes from chickpea rhizobia"

Extended Abstract

With the growing need for food due to the increase of the world's population over the past decades, new techniques emerged in agriculture namely the use of chemical fertilizers, pesticides and herbicides which became a major source of pollution, leading to watercourses eutrophication, destruction of flora and fauna, and directly or indirectly affecting human health. With the global growing concern in environment protection, the need to reinvent some of these measures emerged. A strategy to promote sustainable agriculture involves the use of "Plant Growth Promoting Bacteria" or PGPB, bacteria present in the rhizosphere that include rhizobia, which have the ability to symbiotically interact with legume plants, promoting its growth by fixing atmospheric nitrogen. Chickpea (*Cicer arietinum*) is a legume native from Turkey's south-western, standing nowadays in second place in the list of the mostly produced grain legumes in the world. However, rhizobia that are capable to establish symbiosis with this plant are far from being fully characterized. Understanding the molecular mechanisms involved in this symbiosis may contribute to develop strategies to improve the cultivation of this legume, either by increasing its production rate or improving tolerance against biotic and abiotic stress factors.

Many genes are involved in the symbiosis rhizobia/chickpea, namely the *nif* genes, which are involved in the formation of the nitrogenase complex that promotes the atmospheric nitrogen fixation, and the *nod* genes, which are responsible for the root nodulation process. Among these genes stands out the *nodD* gene, that encodes the *NodD* protein, a transcriptional regulator belonging to the LysR family, responsible for mediating the interaction between flavonoids produced by the plant and the expression of the *nod* genes involved in the host recognition, root infection and nodule formation by rhizobia.

The main objective of this project is the detailed study of the *nodD* gene in chickpea *Mesorhizobium* species. The specific objectives are i) to investigate *nodD* genetic diversity among chickpea *Mesorhizobium* strains, including *Mesorhizobium ciceri* and *M. mediterraneum*, ii) to investigate if the overexpression of the *nodD* gene can lead to an increment in symbiotic effectiveness; iii) to investigate if the overexpression of heterologous *nodD* gene can change rhizobia plant host range.

Five strains of chickpea rhizobia were transformed with the expression vector containing the pRK415 with the *nodD* gene from strain *M. mediterraneum* Ca36. The strains were characterized in terms of growth in liquid medium, nodulation kinetics and symbiotic effectiveness. The evaluation of the symbiotic performance of strains V15b and ST2 showed that, despite not having a significant increase in nodule number with the extra copy of *nodD*, showed an increase of the symbiotic efficiency in the order of 100%. This work, that represents the first attempt to improve the symbiotic efficiency of rhizobia with a symbiotic gene, clearly shows that this is a promising strategy for obtaining more efficient rhizobia inoculants.

Keywords: Overexpression; Rhizobia; Symbiosis genes; *nod gene*, chickpea

Lista de Abreviaturas

ACC – 1-aminociclopropano-1-carboxilato

ATP – Adenosina Trifosfato

Bases nucleotídicas: C – citosina; G- guanina; A- adenina; T- timina; U- uracilo

BSA – Albumina de Soro Bovino

DMSO – Sulfóxido de Dimetilo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kpb – Kilo pares de bases

LB – “Luria-Bertani Medium”

LQO – Lipo-quito-oligossacarídeo

LTTRs – “LysR-Type Transcriptional Regulators”

O.D. – Densidade Óptica

Pb – Pares de bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PGPR – “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”

RNA – Ácido Ribonucleico

rpm – Rotação por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SE – Eficiência Simbiótica

sp. – Espécie

TAE – Tris-acetato EDTA

TBE – Tris-borato EDTA

TSAP – “Thermosensitive Alkaline Phosphatase”

U – Unidade

UV – Ultra Violeta

w/v – Peso/Volume

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Árvore filogenética <i>Neighbour-joining</i> , baseada em sequências de gene <i>nodD</i> de 17 isolados de mesorizóbios noduladores de planta de grão-de-bico e outros rizóbios noduladores de diferentes hospedeiros (918 bp). A escala indica 0.01 substituições entre nucleótidos.	34
Figura 2	Árvore filogenética <i>Neighbour-joining</i> , baseada em sequências de gene 16S rRNA de 17 isolados de mesorizóbios noduladores de planta de grão-de-bico e outros rizóbios noduladores de diferentes hospedeiros (1370 bp). A escala indica 0.01 substituições entre nucleótidos.	35
Figura 3	Análise de <i>Southern blot</i> do número de cópias e localização do gene <i>nodD</i> .	37
Figura 4	Análise de electroforese de RT-PCR dos genes <i>nodD</i> e rRNA 16S do cDNA da estirpe V-15b e respectivas transformadas. Marcador - 1 Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen); Amostras - amplificação do gene <i>nodD</i> : 1- V-15b, 2- V-15b pRK415, 3- V-15b pRK <i>nodD</i> ; amplificação do gene rRNA 16S: 4- V-15b, 5- V-15b pRK415, 6- V-15b pRK <i>nodD</i> .	38
Figura 5	Curva de Crescimento da estirpe V-15b e das respectivas transformadas V-15bpRK415 e V-15bpRK <i>nodD</i> .	40
Figura 6	Curva de Crescimento da estirpe ST-2 e das respectivas transformadas ST-2pRK415 e ST-2pRK <i>nodD</i> .	41
Figura 7	Curva de Crescimento da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas SL-9pRK415 e SL-9pRK <i>nodD</i> .	42
Figura 8	Caixa de hidroponia.	43
Figura 9	Cinética de nodulação da estirpe V-15b e das respectivas transformadas V-15bpRK415 e V-15bpRK <i>nodD</i> .	44
Figura 10	Cinética de nodulação da estirpe ST-2 e das respectivas transformadas ST-2pRK415 e ST-2pRK <i>nodD</i> .	45

Figura 11	Cinética de nodulação da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas SL-9pRK415 e SL-9pRK <i>nodD</i> .	46
Figura 12	Ensaio de crescimento de plantas em vasos de vermiculite com planta de grão-de-bico inoculada com diferentes estirpes de mesorizóbio.	47
Figura 13	Peso seco das raízes. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.	48
Figura 14	Peso seco da parte aérea. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.	48
Figura 15	Peso seco dos nódulos. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.	49
Figura 16	Número de nódulos. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.	49
Figura 17	Eficácia simbiótica. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.	50

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Estirpes utilizadas no presente estudo e respectivas Eficiências Simbióticas com <i>Cicer arietinum</i> .	14
Tabela 2	<i>Iniciadores</i> utilizados na amplificação do gene <i>atpD</i> .	16
Tabela 3	<i>Iniciadores</i> utilizados na amplificação do gene <i>recA</i> .	17
Tabela 4	<i>Iniciadores</i> utilizados na amplificação do gene <i>nodD</i> .	17

Índice

	Página
Introdução Geral	1
1. Bactérias promotoras de crescimento de plantas	2
2. Rizóbio	3
3. Diversidade fenotípica e genômica dos rizóbios	4
4. Mecanismos de simbiose	6
4.1. Especificidade da simbiose	6
4.2. Mecanismos de nodulação	7
4.3. Fixação do azoto atmosférico	7
5. Genes simbióticos	8
5.1. Genes envolvidos na nodulação	8
6. O género <i>Mesorhizobium</i>	9
6.1. Utilização dos mesorizóbios na agricultura	10
6.2. Bases moleculares da simbiose e da tolerância ao stress em mesorizóbios	11
Objetivo Geral	13
Métodos e Materiais	14
1. Análise da sequência do gene de simbiose <i>nodD</i>	14
1.1. Estirpes de rizóbios de grão-de-bico	14
1.2. Isolamento de DNA total	15
1.2.1. E.N.Z.A ® Bacterial DNA Kit	15
1.2.2. Extração rápida de DNA	16
1.3. Amplificação por PCR dos genes <i>atpD</i> e <i>recA</i>	16
1.3.1. Gene <i>atpD</i> (atp synthase β)	16
1.3.2. Gene <i>recA</i> (DNA recombinase A)	17
2. Análise filogenética do gene <i>nodD</i>	17
3. Localização e organização dos genes de simbiose	18
3.1. Híbridação de <i>Southern Blot</i>	18
3.1.1. Marcação da sonda	19
3.1.2. Digestão enzimática do DNA total	19
3.1.3. Depuração e desnaturação do DNA	19
3.1.4. Transferência do DNA para as membranas	20

3.1.5. Fixação do DNA às membranas	20
3.1.5.1.Hibridação	20
3.1.6. Lavagem	21
3.1.7. Detecção	21
3.1.8. “Stripping” das membranas	22
4. Sobre-expressão do gene <i>nodD</i> nas estirpes de rizóbio seleccionadas	22
4.1.Clonagem do gene <i>nodD</i> no vetor de clonagem pCR-Blunt	22
4.1.1. Amplificação do gene <i>nodD</i>	22
4.1.2. Purificação do produto da amplificação do gene <i>nodD</i>	22
4.1.3. Análise e detecção da sequência do gene <i>nodD</i> por electroforese.....	23
4.1.4. Ligação do gene <i>nodD</i> ao vetor pCR-Blunt	23
4.2.Transformação da estirpe NZYstar de <i>Escherichia coli</i> com o vetor pCR-Blunt + sequência do gene <i>nodD</i>	23
4.2.1. Transformação	23
4.2.2. Digestão enzimática do vetor pCR-Blunt transformado com o gene <i>nodD</i>	24
4.3. Subclonagem do gene de simbiose <i>nodD</i> no vetor de expressão pRK415	25
4.3.1. Digestão enzimática do vetor de expressão pRK415	25
4.3.2. Desfosforilação e inactivação enzimática	25
4.3.3. Purificação	25
4.3.4. Ligação	26
4.4.Transformação da células competentes NZY5 α com o vetor pRK415 transformado com o gene <i>nodD</i>	26
4.5.Transformação da estirpe DH5 α de <i>E. coli</i> com o vetor pRK415 + o gene <i>nodD</i>	27
4.5.1. Eletroporação	27
4.6.Transformação das estirpes de rizóbio por conjugação triparental	27
4.6.1. Método da conjugação triparental	27
4.6.2. Isolamento dos rizóbios transformados	28
5. Testes fenotípicos nas estirpes transformadas com a cópia extra de gene <i>nodD</i>	28
5.1. Curvas de crescimento	28
5.2. Performance simbiótica.....	29
5.2.1. Ensaio hidropónicos	29
5.2.1.1.Pré-germinação das sementes de grão-de-bico	29
5.2.1.2.Inoculação das sementes de grão-de-bico	29

5.2.2. Ensaio em vaso	30
5.2.2.1. Pré-germinação das sementes de grão-de-bico	30
5.2.2.2. Inoculação das sementes de grão-de-bico	30
6. Avaliação da expressão do gene <i>nodD</i> por RT-PCR semi-quantitativo	31
6.1. Extração de RNA	31
6.2. Síntese de cDNA	32
6.3. Análise da expressão do gene <i>nodD</i>	32
Resultados	33
1. Confirmação da identificação das estirpes de rizóbio com base nos genes <i>atpD</i> ou <i>recA</i>	33
2. Análise filogenética do gene de simbiose <i>nodD</i>	33
3. Detecção do gene <i>nodD</i>	36
4. Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio transformadas	38
4.1. Confirmação da transformação e da expressão do gene <i>nodD</i>	38
4.2. Curvas de crescimento	39
4.3. Cinética de nodulação	43
4.4. Performance simbiótica	47
Discussão e Conclusões	52
Perspetivas Futuras	57
Referências Bibliográficas	58
Anexos	66

Introdução Geral

A planta de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), originária do sudoeste da Turquia, é atualmente a segunda planta leguminosa mais produzida no mundo, possuindo uma elevada importância na dieta humana. Devido à sua elevada produção existe a necessidade de utilizar grandes quantidades de fertilizantes industriais que acabam por causar problemas do ponto de vista ambiental, como a contaminação de solos e de cursos hídricos.

Com vista à substituição das técnicas tradicionais de fertilização dos solos, a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) parece surgir como uma ótima alternativa. Dentro do grupo dos PGPR encontram-se os rizóbios, bactérias ubíquas nos solos que possuem a capacidade de formar simbiose com plantas leguminosas através da formação de nódulos que por sua vez permitem a fixação do azoto atmosférico. Esta simbiose depende altamente da interação molecular existente na rizosfera entre a planta-hospedeiro que segrega flavonóides e rizóbio que produz fatores de nodulação específicos, permitindo assim o “reconhecimento” entre o hospedeiro e simbiote. No entanto muitos dos fatores que levam a que esta simbiose ocorra ainda não estão bem estabelecidos, existindo assim a necessidade de os investigar com vista a obter inóculos comerciais mais eficientes no ponto de vista da fixação de azoto, aumento da eficiência simbiótica e da tolerância a stresses abióticos e na diminuição da transmissão de informação genética lateral. Por consequência, esta pode levar à transformação de espécies nativas e a uma diminuição gradual da eficiência dos inóculos (Glick, 2012).

O género *Mesorhizobium* possui uma elevada diversidade de espécies com diversas formas de organização dos seus genomas. Isto ligado à grande variedade de possíveis hospedeiros e à sua elevada distribuição mundial, permite elegê-lo como um excelente modelo no estudo da evolução das capacidades simbióticas dos rizóbios (review de: Laranjo *et al.*, 2014). Através do estudo dos seus genes de simbiose, como os genes de nodulação (*nod*) e os genes responsáveis pela fixação do azoto (*nif* e *fix*), existe a possibilidade de aumentar o conhecimento nesta área e a capacidade de obtenção de inóculos comerciais otimizados.

Entre os genes de nodulação essenciais para a formação dos nódulos encontra-se o gene *nodD* que codifica a proteína NodD, um regulador transcricional da família das LysRs, que

regula a transcrição do operão *nodABCIIJ* (genes responsáveis pela síntese dos fatores nod), sendo assim o principal regulador no processo de reconhecimento do hospedeiro e sua infecção e pela formação dos nódulos (Oldroyd, 2013). O papel do gene *nodD* em todo o processo de formação e desenvolvimento dos nódulos torna-o um dos genes mais importantes no processo de simbiose. Este trabalho foca justamente o gene *nodD*, incluindo o seu estudo filogenético dentro do género *Mesorhizobium* e a sua utilização em engenharia genética com vista à obtenção de estirpes com maior eficiência simbiótica.

A investigação dos genes responsáveis pelos processos de simbiose é importante para a obtenção de estirpes optimizadas para a utilização comercial. Este trabalho pretende contribuir para um maior conhecimento da especificidade entre mesorizóbios e grão-de-bico nomeadamente no que diz respeito ao papel do gene *nodD*. Será possível aumentar a eficiência de nodulação de estirpe de mesorizóbio através da introdução de cópia extra de *nodD*? Será possível alterar a especificidade de estirpe com a introdução de gene *nodD* exógeno?

1. Bactérias promotoras de crescimento de plantas

O crescimento das plantas é influenciado por fatores bióticos e abióticos presentes no ambiente que as rodeia, principalmente na rizosfera, a zona do solo circundante às raízes onde ocorrem processos metabólicos importantes para a planta (Saharan *et al.*, 2011). Na rizosfera é possível encontrar uma grande variedade de microrganismos como bactérias, fungos, protozoários entre outros. Sendo as bactérias as mais abundantes, a probabilidade de haver influência bacteriana na fisiologia das plantas é grande, especialmente considerando as bactérias colonizadoras de raízes (Barriuso *et al.*, 2008). Os microrganismos que estão presentes na rizosfera podem ser classificados de acordo com o efeito que têm para as plantas e na maneira como interagem com as raízes, sejam estes efeitos benéficos, nefastos ou neutros, podendo estas interações depender não só do comportamento destes microrganismos mas também das condições do solo (Lynch *et al.*, 1991). Por exemplo, um organismo que promove o crescimento de uma planta através da fixação do azoto atmosférico que costuma estar presente em quantidades limitadas no solo, não irá ter o mesmo efeito na planta caso o solo já esteja rico em azoto devido à sua adição prévia como ocorre nas técnicas de agricultura atuais (Glick, 1995). As bactérias que promovem efeitos benéficos nas plantas são chamadas de PGPR ou seja “Plant Growth Promoting

Rhizobacteria” e podem beneficiar a planta de várias maneiras, seja como supressores de doenças, conferindo resistência a agentes patogênicos (bioprotetores), aumentando a aquisição de nutrientes (biofertilizantes) ou ajudando na produção de fitohormonas (bioestimuladores). O interesse e o estudo deste tipo de microrganismos têm vindo a aumentar nos últimos tempos, visto serem uma forte alternativa à utilização de fertilizantes químicos, pesticidas e de outros suplementos agressivos para o meio-ambiente (Shakilabanu *et al.*, 2012). Os rizóbios são PGPR pois promovem o crescimento de plantas leguminosas através da fixação do azoto atmosférico que ocorre em nódulos nas raízes da planta.

2. Rizóbio

O termo Rizóbio (*Rhizobia*), foi utilizado originalmente para identificar bactérias pertencentes ao género *Rhizobium*. No entanto, hoje em dia existem outros géneros nos quais foram identificados e classificados rizóbios, tal como *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) e *Agrobacterium* (Rhijn *et al.*, 1995). Classificam-se como bactérias Gram-negativas em forma de bastonete que podem ser encontradas no solo e destacam-se pela sua capacidade de formar nódulos em plantas leguminosas, atuando como fixadores do azoto atmosférico, o que, para além de ajudar no crescimento e desenvolvimento da planta, permite também reduzir a quantidade de fertilizantes azotados aplicados na agricultura (Young *et al.*, 1996). Até muito recentemente julgava-se que os rizóbios pertenciam exclusivamente à classe α -*Proteobacteria*, nomeadamente na ordem *Rhizobiales*, onde tbém se incluem várias espécies que não são simbiotes de plantas leguminosas. No entanto sabe-se hoje que existem simbiotes específicos de plantas leguminosas selvagens que são identificados como rizóbios pertencentes à classe β -*Proteobacteria* (Moulin *et al.*, 2001). A simbiose leguminosas-rizóbios é de elevada importância para a agricultura sustentável, e garante a continuação do ciclo do azoto. No entanto, para que uma simbiose entre planta e rizóbio seja possível, existem características destas bactérias que são essenciais, como a presença dos genes de simbiose que estão envolvidos na formação de nódulos nas raízes e na formação de um complexo enzimático de fixação de azoto (Laranjo *et al.*, 2013). Inicialmente os flavonóides das plantas são reconhecidos pela proteína NodD. Este regulador induz os genes de nodulação (*nodABC*) que codificam a formação de enzimas responsáveis pela biossíntese e secreção de fatores Nod, que são lipo-quitto-oligossacarídeos (LQO) que induzem a iniciação da formação dos nódulos nas raízes (Spaink *et al.*, 1998). A

estrutura dos LQO varia tendo em conta o tamanho do oligossacarídeo estrutural, o tipo de ácidos-gordos nos terminais não redutores e no número e tipo de grupos substituintes presentes na molécula. Os genes ligados à fixação do azoto (*nif* e *fix*), incluem genes estruturais para a formação do complexo nitrogenase (*nifHDK*), o complexo responsável pela fixação do azoto atmosférico (Spaink *et al.*, 1998).

A associação dos rizóbios às plantas leguminosas é altamente específica, possuindo cada estirpe de rizóbio um conjunto de espécies de plantas hospedeiras com as quais consegue formar simbiose (Perret *et al.*, 2000). No entanto, cada estirpe de rizóbio só pode ser considerada efectiva se possuir a capacidade não só de formar nódulos mas também de fixar o azoto atmosférico. A eficiência simbiótica de uma estirpe de rizóbio é uma estimativa tendo em conta a sua capacidade de promoção do crescimento da planta hospedeira e é normalmente baseada na diferença do peso seco da parte aérea de plantas inoculadas em relação a plantas não inoculadas (Gibson, 1987).

3. Diversidade fenotípica e genómica dos rizóbios

As classes α -*Proteobacteria* e β -*Proteobacteria*, albergam os mais variados grupos de bactérias Gram-negativas como os rizóbios e outras bactérias promotoras de crescimento de plantas, ou bactérias patogénicas para plantas e animais. Hoje em dia ainda não existe uma ideia concreta da quantidade de bactérias que possuem a capacidade de formar simbiose com plantas, sendo descobertas e descritas ano após ano novas estirpes de rizóbios, distribuindo-se pelas classes α -*Proteobacteria* e β -*Proteobacteria*. Atualmente existem vários géneros como as *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Shinella*, pertencentes à classe α -*Proteobacteria* e *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Herbaspirillum* da classe das β -*Proteobacteria* que incluem espécies de rizóbios (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>).

Em geral os rizóbios são bactérias Gram-negativas heterotróficas e aeróbicas não esporuladas, em forma de bastonete com algumas exceções como algumas bactérias do género *Bradyrhizobium* que possuem a capacidade de crescer anaerobicamente (Polcyn *et al.*, 2003); bradyrizóbios que possuem capacidades fotossintéticas (So *et al.*, 1994) e estirpes de *Methylobacterium* metilotróficos (Sy *et al.*, 2001).

Uma das formas de diferenciar os mais variados géneros de rizóbios é através análise filogenética baseada no gene que codifica o rRNA 16S, ou outros genes como o gene *dnaJ*, que demonstraram ser bons marcadores filogenéticos para *Proteobacteria* (Alexandre *et al.*, 2008). Os rizóbios apresentam genomas grandes e multipartidos, característica semelhante a outras proteobactérias simbiotes (MacLean *et al.*, 2007). Esta forma de organização genómica poderá de alguma forma potenciar as capacidades adaptativas destas espécies (González *et al.*, 2006). A comparação de genomas representa uma importante ferramenta no estudo da evolução da simbiose entre rizóbios e plantas leguminosas, incluindo a comparação integrada de genomas que permitiu descobertas interessantes, como por exemplo o facto de não existirem genes comuns para todos e apenas específicos para rizóbios (Amadou *et al.*, 2008). Por exemplo os genes *nod* que são genes estruturais específicos para rizóbios, no entanto não se encontram presentes nas estirpes fotossintéticas de *Bradyrhizobium* (Giraud *et al.*, 2007). Por outro lado, genes responsáveis pela fixação do azoto atmosférico são comuns para todos os rizóbios, no entanto também podem ser encontrados noutras espécies não simbiotes (Amadou *et al.*, 2008). O tamanho dos genomas de rizóbio varia entre 5.4 e 9.2 (Mb), contendo um número de plasmídeos entre 0 e 7. Contudo, o maior genoma de rizóbio conhecido, o de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, não possui plasmídeos. (Banfalvi *et al.*, 1988). A distinção entre plasmídeos e cromossomas torna-se muitas vezes difícil ou praticamente impossível devido ao facto destes plasmídeos possuírem um elevado tamanho, sendo por vezes apelidados de mega-plasmídeos possuindo mais de 500kbp, e ao facto de muitas vezes estes plasmídeos também possuírem genes essenciais para a sobrevivência ou replicação da bactéria (Downie *et al.*, 2001). Recentemente, uma nova classe de replicões bacterianas, os “*chromids*”, foram propostos como tendo características híbridas de cromossomas e mega-plasmídeos (Harrison *et al.*, 2010). Nos genomas dos rizóbios considera-se a existência dos dois componentes essenciais, o genoma “nuclear” e o genoma “acessório” (Young *et al.*, 2006). O genoma “nuclear” é maioritariamente cromossomal e inclui os genes essenciais que podem ser encontrados em organismos filogeneticamente próximos. O genoma “acessório” é mais variável, estando localizado principalmente em plasmídeos ou ilhas cromossomais, possuindo valores de G e C mais baixos do que no genoma “nuclear” e apresentando genes mais relacionados com a diversidade fenotípica dos rizóbios como é o caso dos genes de simbiose, sendo mais susceptíveis à transferência lateral entre estirpes (Young *et al.*, 2006; Galardini *et al.*, 2011).

4. Mecanismos de simbiose

4.1. Especificidade de simbiose

As plantas leguminosas são uma família de plantas muito diversificada tendo, grande parte delas, a possibilidade de formar simbiose com rizóbios. No entanto, esta capacidade não existia nas linhas mais antigas, provando que o processo de simbiose planta-rizóbio se deveu a uma evolução mais recente, e conjunta das duas espécies parceiras ao longo de milhares de anos (Lavin *et al.*, 2005).

Os mecanismos que originam a formação dos nódulos e a escolha de parceiros simbiotes ainda não são totalmente compreendidos. Tanto as plantas leguminosas capazes de nodular como as que não são capazes possuem a necessidade de obtenção de compostos azotados. No entanto a possibilidade de co-evolução com rizóbios e a sua utilização na captação do azoto atmosférico demonstrou ser uma mais-valia para a plantas que demonstram esta característica, ainda que por vezes esta associação resulte numa fixação de azoto não muito eficiente (McKey, 1994; Den *et al.*, 2009).

A especificidade da interação dos rizóbios com as plantas hospedeiras deve-se à produção dos fatores de nodulação pelos rizóbios, e à produção de flavonóides pelas plantas (Perret *et al.*, 2000). No entanto, sabe-se que existem outros factores envolvidos na determinação da especificidade, como por exemplo proteínas secretadas pelos rizóbios (Fauvert & Michiels, 2008).

4.2. Mecanismos de nodulação

O processo de simbiose entre a planta hospedeira e o rizóbio simbiote resulta no desenvolvimento de uma estrutura organizada denominada de nódulo (Perret *et al.*, 2000). As plantas produzem flavonóides que variam de espécie para espécie, podendo também cada planta possuir uma gama de diferentes flavonóides que por sua vez são seletivos para diferentes estirpes de rizóbios. Estes metabolitos secundários vão induzir a população de rizóbios presentes no solo a multiplicar-se e a ligar-se às raízes onde o principal regulador que desencadeia o processo de nodulação será o fator NodD, uma vez que é o responsável pelo reconhecimento do flavonóide. A indução dos genes de nodulação (*nod*) pelo fator NodD é essencial para a produção e secreção pelos rizóbios de moléculas sinalizadoras conhecidas como fatores Nod que, por sua vez, irão estimular os pêlos radiculares da planta

provocando o seu enrolamento, começando a partir daí o processo de infecção. Na fase inicial da infecção forma-se o canal infecioso que crescerá intra-radicularmente e onde o rizóbio se multiplica e se diferencia no que irá mais tarde formar a estrutura do nódulo onde o rizóbio muda a sua morfologia, passando-se a designar por bacteroide (Giraud *et al.*, 2007).

4.3. Fixação do azoto atmosférico

O azoto é um elemento químico necessário à vida de todos os organismos vivos, sendo indispensável na síntese proteica, na síntese de ácidos nucleicos e de muitos outros compostos. A fixação do azoto ocorre no interior dos bacteróides nos nódulos das raízes das plantas contribuindo para o ciclo do azoto. Dentro do nódulo são expressados os genes ligados à fixação do azoto, os genes *fix* e *nif*. Estes genes são responsáveis pela formação do complexo enzimático nitrogenase que irá reduzir o azoto atmosférico (N₂) em amónia (NH₄⁺). O complexo enzimático nitrogenase codificado pelos genes *nifHDK* é composto por duas componentes, as subunidades α e β que pertencem à componente I (di)nitrogenase cujo centro ativo possui um centro ferro-molibdénio (FeMo) e são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK* respectivamente. A componente II redutase de dinitrogénio, cujo centro ativo possui um centro ferro-enxofre (FeS) é codificada pelo gene *nifH* (Dean *et al.*, 1993). Este complexo enzimático é altamente sensível à presença de oxigénio tornando-se inativo em situações de elevada concentração de O₂ (Adams *et al.*, 1988), levando também à diminuição da expressão do gene *nifA*, gene responsável pela formação do fator NifA, um regulador positivo dos genes *fix* e *nif*, cuja expressão por sua vez também está dependente de baixas concentrações deste gás (Ditta *et al.*, 1987). De forma a impedir que haja inativação do complexo da nitrogenase os rizóbios utilizam uma proteína similar à hemoglobina, a leghemoglobina, expressa pela planta especificamente nas raízes, resultado da interação hospedeiro-rizóbio, que por sua vez possui a capacidade de se ligar ao oxigénio, controlando os seus níveis até 10⁴ a 10⁵ vezes mais baixo do que o normal, de modo a prevenir a inativação do complexo nitrogenase mas permitindo que os bacteroides respirem e mantenham as suas funções metabólicas (Hunt *et al.*, 1993; Burdass, 2002).

O processo de fixação de azoto é altamente energético, requerendo um mínimo estequiométrico de oito electrões e dezasseis moléculas de ATP para cada molécula de N₂ fixada e ainda proporciona à planta um ambiente livre de stress oxidativo. Em troca a planta providencia hidratos de carbono e água essenciais para a produção de ATP pelo bacteróide.

5. Genes simbióticos

Os rizóbios induzem a formação de nódulos nas raízes das plantas leguminosas onde a fixação de azoto tem lugar. Este processo ocorre na rizosfera e é regulado pelas trocas de sinais moleculares entre a planta hospedeiro e as bactérias. Os genes responsáveis pela formação de nódulos e pelo complexo de fixação de azoto são denominados de genes simbióticos, conhecidos também como genes acessórios uma vez que, sendo importantes para o estabelecimento da relação simbiótica não são essenciais para a sobrevivência ou replicação dos rizóbios. Já foram identificados vários tipos de genes ligados à nodulação tal como *nod*, *nol*, *noe* e *noi*, bem como genes relacionados com a formação do complexo da nitrogenase tal como os genes *nif* e *fix*. Estes genes normalmente estão localizados na proximidade uns dos outros, em ilhas simbióticas cromossomais ou em plasmídeos simbióticos, o que facilita a sua transferência lateral para outras estirpes (Black *et al.*, 2012).

A par da utilização dos genes rRNA 16S e *dnaJ* na identificação de estirpes de rizóbios (Alexandre *et al.*, 2008), alguns genes simbióticos, tais como *nodC*, *nodD*, *nodA* e *nifH*, também podem ser utilizados em análises filogenéticas de forma a caracterizar e descrever melhor as estirpes. Devido à possibilidade de transferência lateral, os genes simbióticos fornecem informação sobre a gama de hospedeiros (Mergaert *et al.*, 1997). Por exemplo, os rizóbios de grão-de-bico pertencem a diferentes espécies de *Mesorhizobium* mas têm genes simbióticos idênticos. As árvores filogenéticas baseadas nestes genes, como *nodC* ou *nifH*, apresentam o agrupamento destes microsimbiontes de acordo com a planta hospedeira e não de acordo com a sua espécie (Laranjo *et al.*, 2008; Laranjo *et al.*, 2012).

5.1. Genes envolvidos na nodulação

O processo de nodulação requer uma interação molecular complexa entre a planta hospedeiro e os rizóbios, baseada na secreção de compostos sinalizadores específicos. As plantas segregam flavonóides que atuam como moléculas sinalizadoras, promovendo a expressão de genes de nodulação (*nod*).

A proteína NodD pertence à classe dos reguladores transcricionais do tipo Lys R (LTTRs), uma família de reguladores transcricionais bem caracterizada ubíqua em organismos eucariotas podendo também ser encontrado em alguns organismos procariotas. Originalmente os LTTRs eram descritos como ativadores transcricionais responsáveis pela transcrição de apenas um gene exibindo uma auto-regulação negativa (Lindquist *et al.*,

1989). No entanto, hoje em dia sabe-se que os LTTRs possuem uma ação mais abrangente na transcrição de genes, podendo atuar tanto como ativadores como repressores de um gene ou de operações de genes (Heroven *et al.*, 2006) como ocorre com a proteína NodD em relação ao operão *nodABCIIJ*. A capacidade da NodD se ligar ao promotor do operão *nodABCIIJ* dependerá da quantidade de flavenóides presentes, no entanto ainda pouco se sabe sobre os fatores que condicionam a ligação e especificidade entre a NodD e os respectivos flavenóides a que se liga (Oldroyd, 2013).

Os genes de nodulação normalmente são expressos constitutivamente em baixas concentrações quando os rizóbios crescem sem a presença de plantas hospedeiro em meios de cultura (Spaink *et al.*, 1987). Os genes *nodA*, *nodB* e *nodC* estão conservados de forma estrutural e funcional fazendo normalmente parte de um único operão (Rhijin *et al.*, 1995 e Long, 1996), possuindo cada um, uma função específica na formação dos lipo-oligossacarídeos, através da expressão de acil-transferase (*nodA*), deacetilase (*nodB*) e N-acetilglucosamina transferase (*nodC*). Os genes *nodI* e *nodJ* também fazem parte do operão *nodABC*, estando localizados a seguir ao *nodC*, sendo responsáveis pela expressão de proteínas de transporte dos lipo-oligossacarídeos (Rhijin *et al.*, 1995).

6. O género *Mesorhizobium*

O género *Mesorhizobium* foi descrito pela primeira vez em 1997 (Jarvis *et al.*, 1997), de forma a renomear uma espécie previamente incluída no género *Rhizobium*. Os mesorizóbios possuem a capacidade de estabelecer simbiose com plantas leguminosas pertencentes a climas temperados, tropicais, sub-tropicais e árticos (Chen *et al.*, 2005), podendo também ocorrer associados endofiticamente com plantas leguminosas (Wei *et al.*, 2007). A sua gama de hospedeiros pode não ser muito abrangente como no caso do *Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium mediterraneum* que, tanto quanto se sabe, só estabelecem relação simbiótica com *Cicer arietinum* (Nour *et al.*, 1994; Nour *et al.*, 1995). Pelo contrário, outros géneros como *Rhizobium*, incluem espécies cuja gama de hospedeiros é muito abrangente, como no caso do *Rhizobium sp.* NGR234 e do *Rhizobium fredii* USDA257 (Pueppke, 1999).

6.1. Utilização dos mesorizóbios na agricultura

A planta leguminosa *Cicer arietinum* tem uma elevada importância na agricultura devido à grande utilização dos seus grãos na dieta humana e de animais, especialmente nas zonas do Mar Mediterrâneo, nos Balcãs e na Índia, estando em segundo lugar na lista de alimentos mais cultivados. A produção a nível mundial desta planta tem vindo a aumentar consideravelmente ao longo dos últimos anos sendo a Índia o país com maior taxa de produção, chegando a alcançar aproximadamente 67% da produção mundial em 2013 segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (<http://faostat.fao.org/>).

Um exemplo de um caso amplamente estudado foi a utilização de inoculantes de mesorizóbio na Austrália aquando da introdução de *Biserrula pelecinus*. Pelo facto de não existirem estirpes nativas capazes de inocular *B. pelecinus*, esta planta foi introduzida em conjunto com uma estirpe específica de *Mesorhizobium*, uma vez que estava adaptada a solos ácidos e secos. Seis anos após a introdução desta planta e do respetivo inoculante, foi feito um estudo com o objetivo de avaliar as suas capacidades de adaptação. Este estudo concluiu que, para além de estarem presentes nos nódulos populações da estirpe de *Mesorhizobium* inoculada inicialmente, também estavam presentes outras estirpes que, adquiriram a capacidade de nodular *B. pelecinus*, ainda que com uma eficiência simbiótica inferior à do inoculante. A rápida evolução destas novas estirpes que adquiriram a capacidade de nodular *B. pelecinus* resultou da transferência lateral de informação genética da ilha genómica da estirpe original de *Mesorhizobium* usada como inoculante, para outras estirpes de *Mesorhizobium* nativas. (Nandasena *et al.*, 2006 e Nandasena *et al.*, 2007). Este estudo demonstra uma boa adaptação por parte de um hospedeiro e respetivo simbiote mas que por si só não asseguram um sistema de produção definitivo a médio-longo prazo, devido à dinâmica que existe entre os sistemas introduzidos e as populações de bactérias nativas. Para ultrapassar estas barreiras será necessário um estudo mais aprofundado dos genes envolvidos no processo de simbiose e dos mecanismos envolvidos na transferência lateral de informação genética, com o objetivo de alcançar inóculos comerciais mais otimizados em que haja um menor risco de transferência lateral de informação genética e por sua vez maior capacidade simbiótica a médio-longo prazo. Estudos em campo em colaboração com agricultores na Tunísia têm demonstrado que a inoculação de plantas de grão-de-bico de diferentes cultivares com estirpes de rizóbio de elevada eficiência de simbiose resultou num

aumento do número de nódulos e de peso seco da parte aérea das plantas (Bem Romdhane *et al.*, 2007).

6.2. Bases moleculares da simbiose e da tolerância a stress em mesorizóbios

De forma a obter inóculos comerciais mais eficientes do ponto de vista da fixação de azoto, é possível seleccionar estirpes de rizóbio nativas ou melhorar geneticamente estirpes de modo a aumentar a sua eficiência simbiótica e tolerância a stresses ambientais. É igualmente desejável minimizar a transmissão lateral de genes introduzidos para as populações nativas. A engenharia genética de rizóbios requer o conhecimento prévio das bases moleculares da eficiência simbiótica e da tolerância a stress.

Existem muitos fatores abióticos no campo que podem condicionar a eficiência simbiótica dos rizóbios, ao nível da capacidade de nodulação ou da fixação de azoto ou ambos (Zahran, 1999). Estes fatores incluem alta salinidade ou extremos de pH do solo, exposição a temperaturas extremas, seca, entre outros. A investigação da resposta genética dos rizóbios a este tipo de fatores de stress pode contribuir para o melhoramento genético de estirpes importantes na agricultura, como estirpes do género *Mesorhizobium* que nodulam grão-de-bico (Alexandre *et al.*, 2014; Laranjo *et al.*, 2014).

Dos genes mais importantes na resposta a stresses de temperatura em rizóbios destacam-se os que codificam chaperones. A expressão dos genes de chaperones *dnaKJ* e *groESL*, foi estudada em estirpes de *Mesorhizobium* (Alexandre *et al.*, 2011). Vários isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico obtidos em diferentes regiões de Portugal foram caracterizadas em termos de tolerância ao frio, ao calor e a choque térmico. A análise da expressão dos genes *dnaKH* e *groESL* por hibridação de *northern* revelou que a maioria dos isolados tolerantes a calor apresentam maior indução de genes destes chaperones (Alexandre *et al.*, 2011). A resposta aos níveis de salinidade do solo por parte das estirpes de *Mesorhizobium* também foi estudada através da análise da expressão dos genes *dnaKJ*, *groESL* e *clpB* em estirpes tolerantes e sensíveis à salinidade (Brígido *et al.*, 2012). No entanto os testes de choque à salinidade apenas demonstraram aumento da expressão do gene *dnaKJ* (Brígido *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que a presença de etileno nas raízes das plantas-hospedeiro pode ter efeitos inibitórios na formação e desenvolvimento dos nódulos durante o processo de

simbiose (Guinel & Geil, 2002). A presença da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, uma enzima responsável pela quebra do ACC, o precursor imediato do etileno nas plantas, transformando-o em amónia e α -cetobutirato permite reduzir os efeitos inibitórios do etileno na formação dos nódulos (Glick *et al.*, 1978). Foi estudada a presença do gene *acdS*, o gene que codifica esta enzima, tendo sido detectado em todas as estirpes de *Mesorhizobium* analisadas e demonstrando elevada similaridade. A análise de genomas sugere que este gene se encontra em ilhas simbióticas, juntamente com os genes de nodulação e de fixação de azoto, tendo sido provavelmente adquirido pelas várias estirpes através da transferência lateral da região simbiótica (Nascimento *et al.*, 2012). A transformação genética com cópia exógena de *acdS* permitiu melhorar a performance simbiótica de rizóbios de grão-de-bico (Nascimento *et al.*, 2012b, 2012c; Brígido *et al.*, 2013).

As capacidades de nodulação e fixação de azoto atmosférico encontram-se normalmente codificadas em ilhas cromossomais simbióticas ou em plasmídeos simbióticos que podem ser mais facilmente transferidos de estirpes para estirpes, o que origina que genomas muito distintos possam albergar genes semelhantes (Laranjo *et al.*, 2008), o que poderá explicar o fato de plantas-hospedeiro conseguirem estabelecer relações de simbiose com várias espécies de rizóbio.

Objetivo geral

- Estudo detalhado do gene *nodD* em espécies de *Mesorhizobium* noduladoras de grão-de-bico.

Objetivos específicos

- Investigar a diversidade do gene *nodD* em várias estirpes de rizóbios de grão-de-bico, incluindo *Mesorhizobium ciceri* e *M. mediterraneum*;
- Investigar se a sobre-expressão do gene *nodD* poderá levar a um aumento da eficiência simbiótica;
- Investigar se a sobre-expressão do gene *nodD* heterólogo será capaz de alterar a gama de hospedeiros de um rizóbio.

Métodos e Materiais

1. Análise da sequência do gene de simbiose *nodD*

1.1. Estirpes de rizóbios de grão-de-bico

As estirpes de rizóbios utilizadas neste estudo foram obtidas de plantas de grão-de-bico, usando solos de várias regiões de Portugal, (Tabela 1). Todas estas estirpes fazem parte da coleção mantida no Laboratório de Microbiologia do Solo-ICAAM na Universidade de Évora. Foram também utilizadas três estirpes tipo: duas têm como hospedeiro o grão-de-bico (UPM-Ca7 e UPM-Ca36) e uma outra obtida a partir de nódulos de *Biserrula pelecinus* (WSM1271).

Tabela 1 – Estirpes utilizadas no presente estudo e respectivas Eficiências Simbióticas com *Cicer arietinum*.

Espécie	Estirpes	SE%
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	UPM-Ca7	41 ^(a)
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	UPM-Ca36	39 ^(a)
<i>M. ciceri</i> <i>bv. biserrulae</i>	WSM1271	-
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	64b	70 ^(b)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	PMI-6	81 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	V-15b	23 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	EE-7	84 ^(b)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	ST-2	4 ^(b)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	S-1	53 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	S-8	83 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	29	71 ^(b)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	PII-3	47 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	G-55	88 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	EE-12	10 ^(b)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	STR-2	40 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	STR-14	64 ^(c)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	SL-9	5 ^(d)
<i>Mesorhizobium</i> <i>sp.</i>	BR-15	21 ^(c)

^(a) Cadahia *et al.* 1986; ^(b) Laranjo *et al.* 2004; ^(c) Alexandre *et al.* 2009; ^(d) Brígido *et al.* 2012)

1.2. Isolamento de DNA total

As extrações de DNA total dos isolados foram realizadas usando o kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit (OMEGA Biotek, Innovations in Nucleic Acid Isolation) utilizando as instruções de fabricante e através dum protocolo de extracção rápida (Rivas, 2001).

1.2.1. E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit

Os isolados foram postos a crescer em 5 ml de MLA a 28°C durante a noite em movimento orbital (150 rpm). Com uma O.D. (*optical density*) a 540nm de aproximadamente 1.5, a suspensão foi colocada num microtubo de 2 ml e centrifugada a 16 000 *xg* durante 3 minutos. As células foram então ressuspendidas com 100 µl de tampão TE e centrifugadas de novo. Adicionaram-se 10 µl de lisozima a 0,05mg/ µl e deixou-se a incubar a 37°C durante 20 minutos. Adicionaram-se por fim 25 mg de contas de vidro e lisaram-se as células com o auxílio do homogenizador. O sobrenadante com as células lisadas foi então transferido para um novo microtubo de 1,5 ml com 100 µl de tampão BTL e 20 µl de Proteinase K Solution, deixando de seguida a incubar a 55°C com movimento orbital de 500 rpm durante 1 hora. Misturaram-se à suspensão 5 µl de RNase A e deixou-se a incubar durante 10 minutos centrifugando de seguida a 10 000 *xg* durante 2 minutos transferindo novamente para um microtubo de 2 ml onde 220 µl de tampão BDL foram adicionados, deixando-se a incubar durante 10 minutos a 65°C. 220 µl de etanol foram adicionados e misturados durante 20 segundos antes de transferir a suspensão para uma coluna HiBind® Mini Column num microtubo de 2 ml, sendo depois centrifugado a 10 000 *xg* durante 1 minuto. A coluna foi então transferida para um novo microtubo de 2 ml e foram adicionados 500 µl de tampão HBC centrifugando novamente a 10 000 *xg* durante 1 minuto. Adicionaram-se 700 µl de tampão DNA Wash à coluna e centrifugou-se a 10 000 *xg* durante 1 minuto, repetindo este passo duas vezes, transferindo no final a coluna para um novo microtubo de 2 ml. 100 µl de tampão de eluição pré-aquecido foram adicionados e a coluna foi posta a incubar a 65°C durante 15 minutos e posteriormente mais 15 minutos à temperatura ambiente, seguida de uma centrifugação a 10 000 *xg* durante 1 minuto. Foi feita uma nova eluição com 50 µl de tampão de eluição a armazenou-se o DNA total a -20°C.

1.2.2. Extração rápida de DNA

Em alternativa ao processo de extracção descrito anteriormente, foi utilizado um protocolo de extracção rápida de DNA, sempre que não era necessário DNA com elevado grau de pureza (Rivas, 2001). As estirpes em estudo foram inoculadas em placas de MLA e postas a incubar a 28°C. Foram então ressuspensas em 200 µl de água ultra pura e recolhidas após centrifugação a 12 000 rpm durante 2 minutos. O precipitado formado foi então ressuspendido com 200 µl de Sarkosyl 0.1% e centrifugado novamente a 12 000 rpm durante 2 minutos para remover o detergente. 100 µl de NaOH 0.05 M foram adicionados ao precipitado formado, tendo sido a suspensão formada aquecida a 100 °C durante 4 minutos e colocada imediatamente em gelo durante alguns segundos até à adição de 600 µl de água pura. Por fim, a suspensão foi centrifugada a 4 000 rpm durante 3 minutos para depositar todos os restos celulares e foram transferidos 400 µl da suspensão contendo o DNA total para um novo microtubo que foi guardado a -20°C.

1.3. Amplificação por PCR dos genes *atpD* e *recA*

De forma a confirmar que as estirpes que fazem parte da coleção mantida no Laboratório de Microbiologia do Solo-ICAAM na Universidade de Évora se mantinham puras sem qualquer tipo de contaminação, foram analisadas as sequências dos genes *atpD* e *recA*.

1.3.1. Gene *atpD* (ATP synthase β)

Os iniciadores utilizados na amplificação e sequenciação do gene *atpD* encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados na amplificação do gene *atpD*

(Gaunt *et al.* 2001)

Iniciador	Sequência
<i>atpD</i> -F	5' - ATC GGC GAG CCG GTC GAC GA - 3'
<i>atpD</i> -R	5' - GCC GAC ACT TCC GAC CNG CCT G - 3'

Uma reacção de PCR de 50µl foi preparada com 10µl de DNA molde, 1 U de polimerase Fidelity™, 1X tampão de reacção contendo 1.5 mM de MgCl₂, 5% de DMSO,

0.2 mM de dNTP's e 25 pmol de cada iniciador. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de hibridação a 60°C e 2 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 72°C.

1.3.2. Gene *recA* (DNA recombinase A)

Os iniciadores utilizados na amplificação e sequenciação do gene *recA* encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados na amplificação do gene *recA*.

(Gaunt *et al.* 2001)

Iniciador	Sequência
<i>recA-F</i>	5' - ATC GAG CGG TCG TTC GGC AAG GG - 3'
<i>recA-R</i>	5' - TTG CGC AGC GCC TGG CTC AT - 3'

Uma reação de PCR de 50µl foi preparada com 10µl de DNA molde, 1 U de polimerase FidelityTM, 1X tampão de reação contendo 1.5 mM de MgCl₂, 5% de DMSO, 0.2 mM de dNTP's e 25 pmol de cada iniciador. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de hibridação a 60°C e 2 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 72°C.

2. Análise filogenética do gene *nodD*

Para a amplificação da sequência completa do gene *nodD*, foram desenhados iniciadores a partir de sequências do gene *nodD* de *Mesorhizobium ciceri* CMG6, cujo genoma completo está disponível na base de dados da JGI IMG (Integrated Microbial Genomes; Acedido em: Link – (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?section=FindGenesBlast&page=geneSearchBlast>); (*NodD*-CMG6-F-*PstI* 5'-CTG CAG TAT GCG TTT CAA AGG ACT TG-3', *NodD*-CMG6-R 5'-GCA TGC TCA CAG CGG GGC AGC CAT CC-3'). Os iniciadores desenhados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados na amplificação do gene *nodD*.

Iniciador	Sequência
<i>nodD</i> -CMG6-F- <i>PstI</i>	5' - CTG CAG TAT GCG TTT CAA AGG ACT TG - 3'
<i>nodD</i> -CMG6-R	5' - GCA TGC TCA CAG CGG GGC AGC CAT CC - 3'

Uma reação de PCR de 50µl foi preparada com 10µl de DNA molde, 1 U de polimerase *Taq* (Fermentas), 1X tampão de reação, 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's e 30 pmol de cada iniciador. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 95°C, 10 segundos de hibridação a 58°C e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 72°C.

Após a amplificação e confirmação das sequências do gene *nodD* por electroforese, fez-se a quantificação do DNA foi feita utilizando o Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). As reações de sequenciação foram realizadas pela Macrogen (Seul, Coreia) e os resultados foram analisadas com o auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

Como forma de analisar a filogenia do gene *nodD* dentro das estirpes em estudo e em comparação com outras estirpes, foram obtidas árvores filogenéticas, através da utilização do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA 6) utilizando o método de *Neighbour-Joining*, baseado na comparação da distância matriz com a distância corrigida calculada pelo modelo de dois parâmetros de Kimura. A robustez da árvore foi avaliada utilizando análises em *bootstrap*, com 1000 réplicas.

3. Localização e organização dos genes de simbiose

3.1. Hibridação de *Southern blot*

Para se investigar a localização e o número de cópias do gene de simbiose *nodD* nas estirpes de rizóbio de grão-de-bico foi feita uma hibridação por *Southern blot*.

3.1.1. Marcação da sonda

Foi obtida uma sonda com o gene *nodD* para ser utilizada na hibridação do gene na membrana de *Southern blot*. Uma reação de PCR de 50µl foi preparada com 0.5 µl de DNA molde contendo a sequência de gene *nodD* amplificada, 1 U de *GoTaq* (Promega), 5x tampão de reação, 25 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP “*labeling*” (Roche), 30 pmol de cada iniciador. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 95°C, 10 segundos de hibridação a 58°C e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 72°C.

3.1.2. Digestão enzimática do DNA total

Das estirpes de rizóbio selecionadas, foram feitas digestões enzimáticas do DNA total isolado recorrendo à enzima de restrição *Sca I* (Promega). As digestões com esta enzima de restrição permitiram restringir em locais de restrição específicos, o DNA de forma a não cortar o gene *nodD*, possibilitando assim verificar o número de cópias existentes nestas estirpes. A digestão enzimática decorreu durante 2 horas a 37°C, tendo sido utilizado numa reação de 60µl, 2µg do DNA extraído, tampão 10x H, BSA 1 µg/µl, água ultra pura e 48 U de *Sca I*. O produto das restrições foi então posto a correr num gel de electroforese 0,8% (w/v) de agarose com 1X Tampão TBE (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8.3), a 80 Volts durante 5 horas, utilizando 1kb Plus DNA Ladder – 100ng/µl (Invitrogen) como marcador molecular e 6 µl de Orange G (0.25% Orange G e 30% glicerol), como tampão de marcação. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado através do software Kodak Gel Logic 100 (Kodak®) com o auxílio de um transiluminador de Ultra Violeta (UV). Antes de prosseguir para a transferência do DNA para uma membrana, removeu-se o marcador e a região dos poços.

3.1.3. Depuração e desnaturação do DNA

O gel obtido anteriormente foi colocado num banho HCl 0.25 M durante 18 minutos à temperatura ambiente com uma rotação orbital de 55 rpm, de seguida retirou-se o HCl e adicionou-se água destilada estéril para retirar o HCl do gel. Retirou-se a água destilada estéril e adicionou-se então tampão de desnaturação (0.5 M NaOH, 1.5 NaCl) durante 15 minutos à temperatura ambiente com uma rotação orbital de 55 rpm, repetindo este passo

duas vezes. Lavou-se o gel com água destilada estéril retirando-se o tampão de desnaturação. Colocou-se o gel num tampão de neutralização (0.5 M Tris-HCl pH = 7.5 + 1.5 M NaCl), durante 15 minutos, à temperatura ambiente com uma rotação orbital de 55 rpm lavando-se novamente com água destilada estéril no final dos 15 minutos. Por fim retirou-se a água e colocou-se o gel em 20X SSC (175.3 g NaCl + 88.2 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O), durante 10 minutos à temperatura ambiente com agitação orbital de 55 rpm.

3.1.4. Transferência do DNA para as membranas

Foi montado um sistema para proceder à transferência do DNA para as membranas, numa caixa foi colocado um vidro sobre este foi colocada uma folha de papel de filtro 3 MM de forma a tocar no fundo da caixa onde foi colocado 20x SSC, este onde se colocou o gel obtido anteriormente foi colocado junto com a membrana por cima desta “ponte”. De seguida colocaram-se 3 folhas de papel de filtro 3 MM sobre a membrana e um maço com aproximadamente 12 cm de papel absorvente, sendo este prensado com uma placa de vidro e um peso de aproximadamente 500 g. Deixou-se a solução 20x SSC ascender às folhas de papel absorvente durante 24 horas, e retirou-se a membrana do sistema, lavando-a num banho de 2x SSC.

3.1.5. Fixação do DNA às membranas

Após lavar a membrana num banho de solução 2x SSC, colocou-se entre duas folhas de papel de filtro e deixou-se a incubar a 120°C durante 30 minutos. Depois de deixar arrefecer guardou-se a membrana à temperatura ambiente entre duas folhas de papel de filtro.

3.1.5.1. Hibridação

A membrana foi então colocada num tubo de hibridação com 15 ml de tampão de hibridação (Roche) pré-aquecido a 42°C, ficando a incubar durante 30 minutos num forno de hibridação com uma temperatura de 42°C com rotação constante. Uma sonda obtida primeiramente com o gene *nodD*, foi então desnaturada em água a ferver durante 5 minutos, tendo sido colocada imediatamente em gelo durante 1 minuto. Adicionou-se a sonda desnaturada a tampão de hibridação (Roche) pré-aquecido a 42°C e substituiu-se este

tampão pelo colocado anteriormente no tubo de hibridação com a membrana, deixando a hibridar durante a noite a 42°C.

3.1.6. Lavagem

Retirou-se o tampão de hibridação do tubo de hibridação de forma rápida para evitar a desidratação da membrana e lavou-se duas vezes à temperatura ambiente num banho com tampão de “*Low stringency*” (2x SSC e 0,1% SDS), deixando a incubar em agitação orbital de 55 rpm durante 5 minutos. De seguida lavou-se a membrana duas vezes num banho a 65°C com tampão de “*High stringency*” (0.5x SSC e 0,1% SDS), deixando a incubar em agitação orbital de 55 rpm durante 15 minutos. Lavou-se então a membrana à temperatura ambiente em tampão “*Washing*” (0.1 M ácido Maleico, 0.15 M NaCl e 0.3% tween 20), deixando a incubar em agitação orbital de 55 rpm durante 2 minutos. Retirou-se o tampão “*Washing*” e adicionou-se uma solução “*Blocking*” (Roche) 1x (diluição 1:10 de 10g de reagente “*Blocking*” em 100 ml de tampão de ácido Maleico), incubado a membrana à temperatura ambiente em agitação orbital de 55 rpm durante 2 horas. Após esta incubação adicionou-se solução de anticorpo (antidigoxigenina-AP em “*Blocking*” onde a membrana esteve a incubar 30 minutos à temperatura ambiente com uma agitação orbital de 55 rpm. Lavou-se novamente a membrana com tampão “*Washing*” e após duas lavagens colocou-se a membrana em tampão de detecção (0.1 M Tris-HCl e 0.1 M NaCl),

3.1.7. Detecção

A membrana foi então colocada num saco transparente preenchido com uma diluição de solução CDP-Star (1:100) em tampão de detecção e colocou-se dentro numa cassete. De seguida numa sala escura cortou-se filme e colocou-se sobre a membrana dentro da cassete, deixando a incubar durante 5 minutos. Retirou-se o filme da cassete e lavou-se em três soluções: solução reveladora onde se deixou-se o filme até aparecer sinal, em água para retirar quaisquer vestígios de solução reveladora e por fim em solução fixadora onde se deixou o filme durante 20 minutos, lavando-se novamente em água no final para retirar a solução fixadora e deixou-se secar. Repetiram-se estes passos para mais dois filmes, alterando apenas o tempo de exposição para 10 e 90 minutos.

3.1.8. “Stripping” das membranas

De forma a se poder reutilizar a membrana, foi feito um “Stripping”, retirando-se a sonda. Colocou-se água destilada estéril num tabuleiro e mergulhou-se a membrana rapidamente para esta não secar, deixando esta a incubar durante 1 minuto com agitação orbital de 55 rpm à temperatura ambiente. De seguida lavou-se duas vezes a membrana com um tampão “Stripping” (0.2 M NaOH e 0.1% SDS), pré-aquecido a 37°C. Lavou-se então a membrana em 2x SSC durante 5 minutos com agitação orbital 55 rpm à temperatura ambiente e guardou-se num saco com 2x SSC e armazenou-se 4°C.

4. Sobreexpressão do gene *nodD* nas estirpes de rizóbio selecionadas

4.1. Clonagem do gene *nodD* no Vetor de Clonagem pCR-Blunt

4.1.1. Amplificação do gene *nodD*

A sequência do gene *nodD* utilizada como referência neste estudo foi retirada de estirpe *Mesorhizobium mediterraneum* Ca36^T. A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi preparada em 50 µl, com 1 µl de DNA molde extraído previamente, 1 U de *Taq* polymerase (Fermentas), 1X de tampão, 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's e 30 pmol de cada iniciador: *nodD*-CMG6-F-*Pst*I e *nod*-CMG6-R. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 95°C, 10 segundos de hibridação a 58°C e 1 minuto de extensão a 70°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 70°C.

4.1.2. Purificação do produto da amplificação do gene *nodD*

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Purification Kit (Illustra), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram adicionados 500 µl de Capture Buffer type 3 ao produto agitando-o de seguida. Após uma passagem rápida pelo vortex a suspensão foi transferida para a coluna GFX Microspin Column® e centrifugada a 13 000 rpm durante 1 minuto tendo a solução que fica no tubo coletor sido descartada no final. Foram então adicionados 500 µl de Wash Buffer type 1 e centrifugou-se a coluna novamente a 13 000 rpm durante 1 minuto, descartando a solução que fica no tubo coletor, tendo sido este passo repetido duas vezes. A GFX Microspin

Column® foi transferida para um novo microtubo de 2 ml onde o produto foi eluído com 20 µl de Elution Buffer type 6 que após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi centrifugado a 13 000 rpm durante 1 minuto.

4.1.3. Análise e detecção da sequência do gene *nodD* por electroforese

Os produtos amplificados e purificados foram analisados por electroforese num gel de agarose 1% (w/v) com 0.5X Tampão TBE (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8.3), a 70 Volts durante 1 hora, utilizando 1kb Plus DNA Ladder – 100ng/µl (Invitrogen) como marcador molecular e 2 µl de Orange G (0.25% Orange G e 30% glicerol), como tampão de marcação. O gel de agarose foi então corado com brometo de etídio e fotografado através do software Kodak Gel Logic 100 (Kodak®) com o auxílio de um transiluminador de Ultra Violeta (UV).

A quantificação do DNA foi feita utilizando o Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). As reações de sequenciação foram realizadas pela Macrogen (Seul, Coreia) e os resultados foram analisadas com o auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

4.1.4. Ligação da sequência do gene *nodD* ao vetor pCR-Blunt

Para proceder à ligação do gene *nodD* ao vetor pCR-Blunt, foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Após a quantificação do DNA, foi preparada uma reação com uma razão de 1:2 de vector:insert. Foram adicionados 4 U de T4 DNA Ligase à suspensão com o DNA insert (gene *nodD*), o vector pCR-Blunt, 5x de tampão de ligação e água ultra pura, deixando a incubar durante a noite a 4°C.

4.2. Transformação da estirpe NZYstar de *Escherichia coli* (*E. coli*) com o vetor pCR-Blunt + sequência do gene *nodD*

4.2.1. Transformação

Foi colocada uma alíquota de 50 µl de células competentes NZYstar a descongelar em banho de gelo. Foram adicionados 5 µl da ligação descrita anteriormente (3.1.4) e foi

deixado em gelo durante 30 minutos. Procedeu-se a um choque térmico de 40 segundos em banho a 42°C e voltou-se a colocar em gelo durante 2 minutos. Adicionaram-se 900 µl de meio SOC e incubou-se durante 1 hora na incubadora a 37°C com agitação de 225 rpm. De seguida plaqueou-se em meio LB com 7,5 µg/ml de tetraciclina e 50 µg/ml de canamicina, 0,5 mM de IPTG e 80 µg/ml de X-Gal e deixou-se a incubar a 37°C. Fez-se a extração do plasmídeo de vários clones recorrendo ao kit Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit. As culturas de *E. coli* NZYstar transformadas anteriormente foram colocadas a crescer durante a noite em 5 ml de meio LB, ressuspenderam-se as células e centrifugou-se a 12 000 *xg* durante 1 minuto. Ressuspendeu-se o precipitado formado com 200 µl de *Ressuspension Solution* e adicionaram-se 200 µl de Lysis Solution agitando de seguida o microtubo de forma cuidadosa. Então adicionaram-se 350 µl de Neutralization/Binding Solution e centrifugou-se a 12 000 *xg* durante 10 minutos. Prepararam-se as colunas GenElute Miniprep Binding Column colocando-as em microtubos de 2 ml e adicionando 500 µl de Column Preparation Solution, centrifugando-se posteriormente a 12 000 *xg* durante 1 minuto. Transferiu-se o lisado anteriormente preparado para as GenElute Miniprep Binding e centrifugou-se a 12 000 *xg* durante 1 minuto, descartando a solução do tubo coletor no final. Adicionaram-se 750 µl de Wash Solution e fizeram-se duas centrifugações a 12 000 *xg* durante 1 minuto, descartando a solução do tubo colector. Transferiram-se as colunas para novos microtubos de 2 ml e colocaram-se 50 µl de Elution Solution e após nova centrifugação a 12 000 *xg* durante 1 minuto guardou-se o DNA eluído a -20°C. Por fim confirmou-se a presença do vetor transformado através de electroforese. Foi feita de seguida a sequenciação do plasmídeo para confirmar a ligação da sequência do gene *nodD* ao vetor de clonagem.

4.2.2. Digestão enzimática do vetor pCR-Blunt transformado com a sequência do gene *nodD*

Na digestão enzimática do Vetor pCR-Blunt transformado com a sequência obtida do gene *nodD* foram utilizadas as enzimas de restrição *PstI* e *EcoRI* (Promega). A digestão com estas enzimas de restrição está directamente relacionada com os locais de restrição específicos para a *EcoRI* e para a *PstI* no vetor de clonagem pCR-Blunt, tendo estes sido confirmados com recurso ao programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, sendo assim possível obter um fragmento de 918 pb onde se encontra a sequência do gene *nodD*. A digestão enzimática decorreu durante 2 horas a 37°C, tendo sido utilizado numa reacção de

20µl, 2µl do DNA extraído anteriormente, tampão 10x H, BSA 1 µg/µl, água ultra pura e 6 U de *Eco RI* e 5 U de *PstI*.

A purificação do insert foi feita com recurso ao kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Ilustra), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.3. Subclonagem do gene de simbiose *nodD* no vetor de expressão pRK415

4.3.1. Digestão enzimática do vetor de expressão pRK415

Foi feita uma digestão enzimática ao vetor pRK415 utilizando as enzimas de restrição *PstI* e *Eco RI* (Promega). A digestão com estas enzimas de restrição está directamente relacionada com os locais de restrição específicos para a *Eco RI* e para a *PstI* no vetor pRK415, permitindo a inserção da sequência obtida do gene *nodD* nestes locais. A digestão enzimática decorreu durante 3 horas a 37°C, tendo sido utilizado numa reação de 50µl, 20µl do DNA extraído anteriormente, tampão 10x H, BSA 1 µg/µl, água ultra pura e 24 U de *Eco RI* e 20 U de *PstI*.

4.3.2. Desfosforilação e inativação enzimática

Após a digestão enzimática do vetor de expressão pRK415 com as enzimas *Eco RI* e *PstI*, foi feita a desfosforilação dos grupos de fosfato das extremidades 5' resultantes, impedindo assim que o vetor se volte a ligar mantendo-o linearizado. A desfosforilação foi feita com recurso a 1,5 U de TSAP (Promega) seguida de uma incubação a 37°C durante 20 minutos. A inativação da TSAP e das enzimas de restrição utilizadas na digestão anterior foi alcançada através duma incubação a 65°C durante 15 minutos.

4.3.3. Purificação

A purificação do plasmídeo, um passo importante para assim se excluïrem as enzimas inativas da suspensão, foi feita com recurso ao protocolo descrito no kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Ilustra). Foram adicionados 500 µl de Capture Buffer type 3 e foi feita uma centrifugação rápida para recolher a totalidade da suspensão e transferiu-se então para uma coluna GFX MicroSpin Column. De seguida foi feita uma centrifugação a

13 000 rpm durante 1 minuto descartando-se a solução do tubo coletor. Adicionaram-se 500µl de Wash Buffer type 1 e centrifugou-se de novo a 13 000 rpm durante 1 minuto, repetindo-se os dois últimos passos uma vez mais. Descartou-se a solução do tubo coletor resultante da lavagem e passou-se a coluna para um novo microtubo, onde se adicionaram 20 µl de Elution Buffer type 6 e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e fez-se uma última centrifugação a 13 000 rpm durante 1 minuto, armazenado no final a -20°C a suspensão de vetor pRK415 digerido, desfosforilado e purificado.

4.3.4. Ligação

Para proceder à ligação da sequência de gene *nodD* obtida através da digestão do vetor pCR-Blunt transformado ao vetor pRK415, foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Após a quantificação do DNA com NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), foi preparada uma reação com uma razão de 1:2 de vector:insert. Foram adicionados 4 U de T4 DNA, 5x de tampão de ligação e água ultra pura, deixando a incubar durante a noite a 4°C.

4.4. Transformação de células competentes NZY5α com o vetor pRK415 transformado com a sequência do gene *nodD*

Foi colocada uma alíquota de 50 µl de células competentes NZY5α a descongelar em banho de gelo. Foram adicionados 5 µl da ligação do gene *nodD* ao vetor pRK415 obtida anteriormente e deixado em gelo durante 30 minutos. Procedeu-se a um choque térmico de 40 segundos em banho a 42°C e voltou-se a colocar em gelo durante 2 minutos. Adicionaram-se 900 µl de meio SOC e incubou-se durante 1 hora na incubadora a 37°C com agitação de 225 rpm. De seguida plaqueou-se em meio LB com 15 ng/µl de tetraciclina, 0,5 mM de IPTG e 80 µg/ml de X-Gal e deixou-se a incubar a 37°C. Fez-se a extração do plasmídeo de vários clones recorrendo ao kit Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit e por fim confirmou-se a presença do vetor transformado através de electroforese e digestão enzimática.

4.5. Transformação da estirpe DH5 α de *E.coli* com o vetor pRK415 + sequência do gene *nodD*

4.5.1. Eletroporação

Estirpe DH5 α de *E. coli* é usada como estirpe dadora no processo de conjugação triparental. Tendo em conta a maior eficiência e a optimização do método da eletroporação em relação aos métodos químicos, foi este o método selecionado para proceder a esta transformação, baseado no protocolo apresentado no Bacterial Electro-Transformation and Pulse Controller Instruction Manual version 8-90, section 7 High Efficiency Electro-transformation of *E. coli* e encontra-se dividido em duas fases, a preparação das células electro-competentes e a eletroporação. Descongelou-se o vetor pRK415 transformado com a sequência do gene *nodD* e as células electro-competentes DH5 α em gelo. Enquanto isso colocaram-se o porta-cuvetes e uma cuvette a -20°C e programou-se o eletroporador para 1550 kV. Colocou-se a mistura feita anteriormente com 5 ng/ μ l do vetor transformado, na cuvette previamente arrefecida e iniciou-se a eletroporação. De seguida foram adicionados 500 μ l de SOC e transferiu-se para um novo microtubo estéril onde se incubou a 37°C durante 1 hora com movimento rotacional a 225 rpm, plaqueando-se em meio LB sólido com 15 ng/ μ l de tetraciclina. Fez-se a extração do plasmídeo de vários clones recorrendo ao kit Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit e por fim confirmou-se a presença do vetor transformado através de electroforese e digestão enzimática.

4.6. Transformação das estirpes de rizóbio por Conjugação Triparental

4.6.1. Método da Conjugação Triparental

A conjugação triparental é o método eficaz para transformar estirpes de rizóbio, baseando-se na utilização da estirpe MT616 de *E. coli* possuidora de um plasmídeo de “ajuda” pRK600 que permite a transferência de material genético de uma estirpe “dadora”, a *E. coli* DH5 α transformada com o vetor de expressão pRK415 que contém a sequência do gene *nodD*, ou no caso dos controlos negativos, com o vetor pRK415 e por fim a estirpe de rizóbio pretendida a transformar (Martinez-Abarca *et al.*, 2000). As estirpes de rizóbio a transformar foram deixadas a incubar em placas de TY durante 72 horas a uma temperatura de 28°C, limitadas a um quadrado de 1,5 cm por 1,5 cm desenhado na placa de petri, seguidamente foram colocadas ansadas de cada uma das estirpes de *E. coli* previamente

deixadas a crescer a 37°C durante a noite para o centro do quadrado com rizóbio e foram deixadas a três culturas misturadas a incubar durante 24h a 28°C.

4.6.2. Isolamento dos rizóbios transformados

Terminado o período de incubação das três estirpes misturadas na placa de petri, fez-se uma ressuspensão destas culturas recorrendo a 3 ml de meio mínimo (MM) para rizóbio (solução A (890ml/L): 6 mg/L FeCl₃.6H₂O; 50 mg/L NaCl; 393 mg/L K₂HPO₄.3H₂O; 300 mg/L KH₂PO₄; 1,1 mg/L ácido glutâmico; 2,5 g/L sacarose; solução B (100ml/L): 150 mg/L MgSO₄.7H₂O; 50 mg/L CaCl₂.2H₂O; solução C (10ml/L): 2 mg/L d-biotina; 1 mg/L tiamina-HCl; 1 mg/L pantotenato de cálcio) (Robertsen *et al.* 1981). De seguida foram feitas diluições sequenciais de 1:10, 1:100, 1:1 000 e 1:10 000 das quais se retiraram 100 µl para inocular com o auxílio de esferas de vidro, placas de MM contendo 100 ng/µl de tetraciclina que foram deixadas a incubar a 28°C. Após uma a duas semanas de incubação (a velocidade de crescimento varia de estirpe para estirpe), fez-se repicagem e isolamento de 4 colónias para assim se obterem culturas puras apenas com o rizóbio transformado. Posteriormente, após serem realizadas quatro repicagens para isolamento utilizando o método do riscado, fizeram-se placas em massa em MLB e por fim transferiram-se as culturas puras de estirpes de rizóbio transformadas para meio TY com 15 ng/µl de tetraciclina.

Das culturas purificadas foi feita a extração do plasmídeo pRK415 através da utilização do kit de extração Gen Elute Plasmid Miniprep (Sigma) e posterior amplificação por PCR do gene *nodD*, para assim confirmar se a transformação supracitada foi bem-sucedida.

5. Testes fenotípicos nas estirpes transformadas com a cópia extra do gene *nodD*

5.1. Curvas de Crescimento

Para avaliar a capacidade de crescimento das estirpes V-15b, ST-2 e SL-9 transformadas com a cópia extra do gene *nodD*, foram feitas curvas de crescimento controladas durante 96 horas. Foram colocadas a incubar durante a noite, a uma temperatura de 28°C com agitação orbital de 150 rpm em meio TY líquido, estirpes selvagens, transformadas com o vetor de expressão pRK415 e transformadas com vetor de expressão pRK415 com a sequência do gene *nodD*. Fez-se a leitura da absorvância a 540 nm das

suspensões e diluiu-se de forma a obter um valor de absorvância inicial de 0.1, para assim alcançar uma maior proximidade do número de células inicial de cada estirpe. Incubou-se novamente a 28°C com agitação orbital de 150 rpm e crescimento foi controlado durante 96 horas através da medição da absorvância das culturas a 540 nm de 24 em 24 horas.

5.2. Performance simbiótica

De forma a avaliar o desempenho simbiótico das estirpes V-15b, ST-2 e SL-9 transformadas com a cópia extra do gene *nodD*, foram realizados ensaios de crescimento de grão-de-bico em meio hidropónico e em vasos de vermiculite.

5.2.1. Ensaios Hidropónicos

Os ensaios hidropónicos são uma mais-valia na avaliação da formação de nódulos em tempo real, uma vez que é possível ter acesso às raízes em qualquer altura. Foram avaliados o tempo de formação de nódulos e a quantidade destes durante 35 dias.

5.2.1.1. Pré-germinação das sementes de grão-de-bico

Antes de serem colocadas a germinar, as sementes de grão-de-bico passaram por um processo de desinfeção, prevenindo assim o surgimento de quaisquer contaminações bacterianas e fúngicas durante o ensaio que possam por em causa viabilidade deste. As sementes foram submersas em hipoclorito de cálcio com cloro ativo a 14% durante 45 minutos. Após o período de incubação as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada e foram deixadas a 4°C durante 1 hora em água destilada. De seguida transferiram-se as sementes para placas de agar-água, deixando a ponta das sementes voltada para baixo, de forma a que quando a radícula irrompa, o faça na direcção do meio, cobriram-se as placas com papel de alumínio e foram deixadas a incubar a 28°C durante 48 horas.

5.2.1.2. Inoculação das sementes de grão-de-bico

Foram colocadas a crescer em meio TY durante 72 horas a 28°C, culturas, selvagens, transformadas com o vetor de expressão pRK415 e transformadas com vetor de expressão pRK415 com a sequência do gene *nodD*, das estirpes V-15b, ST-2 e SL-9. Após o período

de incubação fez-se uma centrifugação a 10 000 *xg* durante 5 minutos e ressuspendeu-se o sedimento formado com TY líquido. Ajustaram-se as suspensões bacterianas para O.D. 540 nm a 0.6 com solução nutritiva de hidroponia sem azoto (Harper e Gipson, 1984) (numa diluição 1:4) e colocaram-se num suporte previamente esterilizado com uma rede a suportar as sementes previamente germinadas, de forma a que a suspensão banhasse as radículas, deixando durante a noite a incubar sem luz. Prepararam-se as caixas de hidroponia com 5 L de solução nutritiva e após lavar as sementes com água estéril de forma a retirar o excesso de suspensão bacteriana, com excepção para as plantas de controlo negativo que não foram previamente inoculadas, colocando-se 6 plantas por cada plataforma flutuante, deixando as radículas em contacto com a solução nutritiva que foi substituída uma vez por semana durante 35 dias.

5.2.2. Ensaio em Vaso

5.2.2.1. Pré-germinação das sementes de grão-de-bico

Antes de serem colocadas a germinar, as sementes de grão-de-bico passaram por um processo de desinfecção, como descrito em 5.2.1.1.

5.2.2.2. Inoculação das sementes de grão-de-bico

Foram colocadas a crescer em meio TY líquido durante 72 horas a 28°C, culturas, selvagens, transformadas com o vetor de expressão pRK415 e transformadas com vetor de expressão pRK415 com a sequência do gene *nodD*, das estirpes V-15b, ST-2 e SL-9. Após o período de incubação fez-se uma centrifugação a 10 000 *xg* durante 5 minutos e ressuspendeu-se o precipitado formado com TY líquido, ajustaram-se as suspensões bacterianas para O.D. 540 nm a 1.0 e retirou-se 1 ml de cada suspensão para inocular cada semente. As sementes foram transferidas para vasos de plástico com vermiculite esterilizada. Foram preparadas cinco réplicas por cada estirpe, tendo sido utilizado também como controlo negativo sementes sem inóculo e, como controlo positivo sementes sem inóculo posteriormente regadas com solução nutritiva com azoto (cinco réplicas cada). Foram deixadas a crescer em câmara de incubação com um ciclo de 16 horas com luz e 8 horas sem luz, com temperaturas de 24°C para a fase diurna e 18°C para a fase nocturna, com uma humidade relativa constante de 65% durante 8 semanas. Os vasos foram regados de dois em

dois dias com uma solução de nutrientes sem azoto (Broughton e Dilworth, 1971), e após 8 semanas as plantas foram colhidas, tendo sido medido vários parâmetros como peso seco das raízes, o peso seco da parte aérea, o número de nódulos formados e o peso seco. A análise estatística destes dados foi feita com recurso ao *software ACTION*, no programa *Excel* da *Microsoft office*, através de um teste ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, com comparações múltiplas de Tukey.

6. Avaliação da expressão do gene *nodD* por RT-PCR semi-quantitativo

6.1. Extração de RNA

A extração do RNA foi feita com o auxílio do kit *GeneJet RNA purification* (*Thermo*), recorrendo ao protocolo descrito pelo fornecedor. Foram colocadas a crescer em meio TY líquido durante 72 horas a 28°C, culturas, selvagens, transformadas com o vetor de expressão pRK415 e transformadas com vetor de expressão pRK415 com a sequência do gene *nodD*, das estirpes V-15b, ST-2 e SL-9. Após o período de incubação fez-se uma centrifugação a 10 000 *xg* durante 5 minutos e ressuspendeu-se o sedimento formado com TY líquido, ajustaram-se as suspensões bacterianas para O.D. 540 nm a 0.4. Voltou-se a centrifugar a 10 000 *xg* durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 360 µl de etanol a 96%, agitando o microtubo gentilmente. Transferiu-se a suspensão para um novo microtubo de 2 ml com um coluna *GeneJET RNA Purification Column* e centrifugou-se a 12 000 *xg* durante 1 minuto e descartou-se a solução do tubo coletor. Adicionaram-se 700 µl de tampão *Wash* (suplemento com etanol a 96%) e centrifugou-se novamente a 12 000 *xg* durante 1 minuto, descartando-se a solução do tubo coletor. Adicionaram-se 600 µl de tampão *Wash 2* e fez-se uma nova centrifugação a 12 000 *xg* durante 2 minutos para assim lavar a coluna, repetindo-se este passo novamente mas com 250 µl de tampão *Wash*. A coluna foi transferida para um novo microtubo onde se adicionaram 100 µl de água *RNase-free* para assim eluir através duma centrifugação a 12 000 *xg* durante 1 minuto. Após a extração do RNA procedeu-se a uma reação *Dnase I* com o intuito de remover a contaminação. A reação que foi constituída pelo RNA extraído com tampão 10x com MgCl₂, 1U/ µl de *DNase I* e água ultra pura e foi deixada a incubar a 37°C durante 30 minutos. De seguida foi adicionado 50 mM de EDTA para inativar a *DNase I*, deixando-se a incubar a 65°C durante 10 minutos. O RNA foi purificado usando novamente o kit *GeneJet RNA purification* (*Thermo*), recorrendo ao protocolo descrito pelo fornecedor.

6.2. Síntese do cDNA

A conversão do RNA extraído para cDNA foi feita com recurso ao kit *RevertAid first-strand cDNA synthesis* (Fermentas) seguindo o protocolo sugerido pelo fornecedor. O RNA previamente extraído foi colocado em gelo onde se adicionaram tampão de reação 5x, *RiboLock Ribonuclease inhibitor* (20 u/μl), 10 mM dNTP²s e água RNase free e deixou-se a incubar a 37°C durante 5 minutos. De seguida adicionou-se a *RevertAidM-MuLV Reverse Transcriptase* (200 u/μl) e deixou-se a incubar a 42°C durante 1 hora. No final, para parar a reação, incubou-se a mistura a 70°C durante 10 minutos, transferindo-a imediatamente para gelo após a incubação.

6.3. Análise da expressão do gene *nodD*

Após a extração do RNA das extirpes em estudo e a sua conversão em cDNA, uma reação de PCR de 25μl foi preparada com 2 μl de cDNA para amplificar o gene *nodD* e 3.5 μl na amplificação do gene rRNA 16S, usando polimerase *Gotaq* (Promega), 1X tampão de reação, 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's e 7,5 pmol de iniciadores desenhados para cada gene. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 2 minutos a 95°C na fase de desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 95°C, 10 segundos de hibridação a 51°C e 2 minutos de extensão a 70°C, finalizando com uma fase de 5 minutos de extensão final a 70°C.

Os produtos de PCR foram então analisados num gel de electroforese 0,8%(w/v) de agarose com 1X Tampão TBE (90 mM Tris; 90 mM ácido bórico; 2 mM de EDTA; pH 8.3), a 80 Volts durante 1 hora, utilizando 1kb Plus DNA Ladder – 100mg/μl (Invitrogen) como marcador molecular. O gel foi fotografado através do software Kodak Gel Logic 100 (Kodak®) com o auxílio de um transiluminador de Ultra Violeta (UV), onde se comparou a intensidade das bandas do gene *nodD*, utilizando o gene rRNA 16S como forma de normalizar a amplificação do gene *nodD*.

Resultados

1. Confirmação da identificação das estirpes de rizóbio com base nos genes *atpD* ou *recA*

As 17 estirpes utilizadas no presente estudo são estirpes noduladoras de *Cicer arietinum* pertencentes à coleção mantida no Laboratório de Microbiologia do Solo-ICAAM na Universidade de Évora (*Mesorhizbium sp.*).

A identificação das estirpes foi confirmada através da análise da sequência dos genes *atpD* ou *recA*, e sua comparação com as sequências anteriormente determinadas. Todas as estirpes foram confirmadas (resultados não apresentados).

2. Análise filogenética do gene de simbiose *nodD*

Para proceder à análise filogenética do gene *nodD* foram amplificadas sequências com 918 pb das 17 estirpes noduladoras de *Cicer arietinum*, utilizando iniciadores desenhados a partir de sequências do gene *nodD* de *Mesorhizobium ciceri* CMG6.

Como forma de comparar as sequências amplificadas foram selecionadas sequências do gene *nodD* pertencentes a várias estirpes que nodulam outros hospedeiros, cujos genomas se encontram completamente sequenciados e disponíveis na base de dados do JGI IMG (Integrated Microbial Genomes). Foram comparadas várias estirpes de *Mesorhizobium* noduladoras de vários hospedeiros e foram utilizados como *outgroup* as sequências de *nodD* de *Bradyrhizobium elkanii* e de *Ensifer meliloti*. Para verificar se o agrupamento por espécie varia da mesma forma que o agrupamento feito através das sequências de *nodD*, fez-se uma árvore filogenética para as mesmas estirpes, baseada no gene do rRNA 16S (Figura 1 e 2).

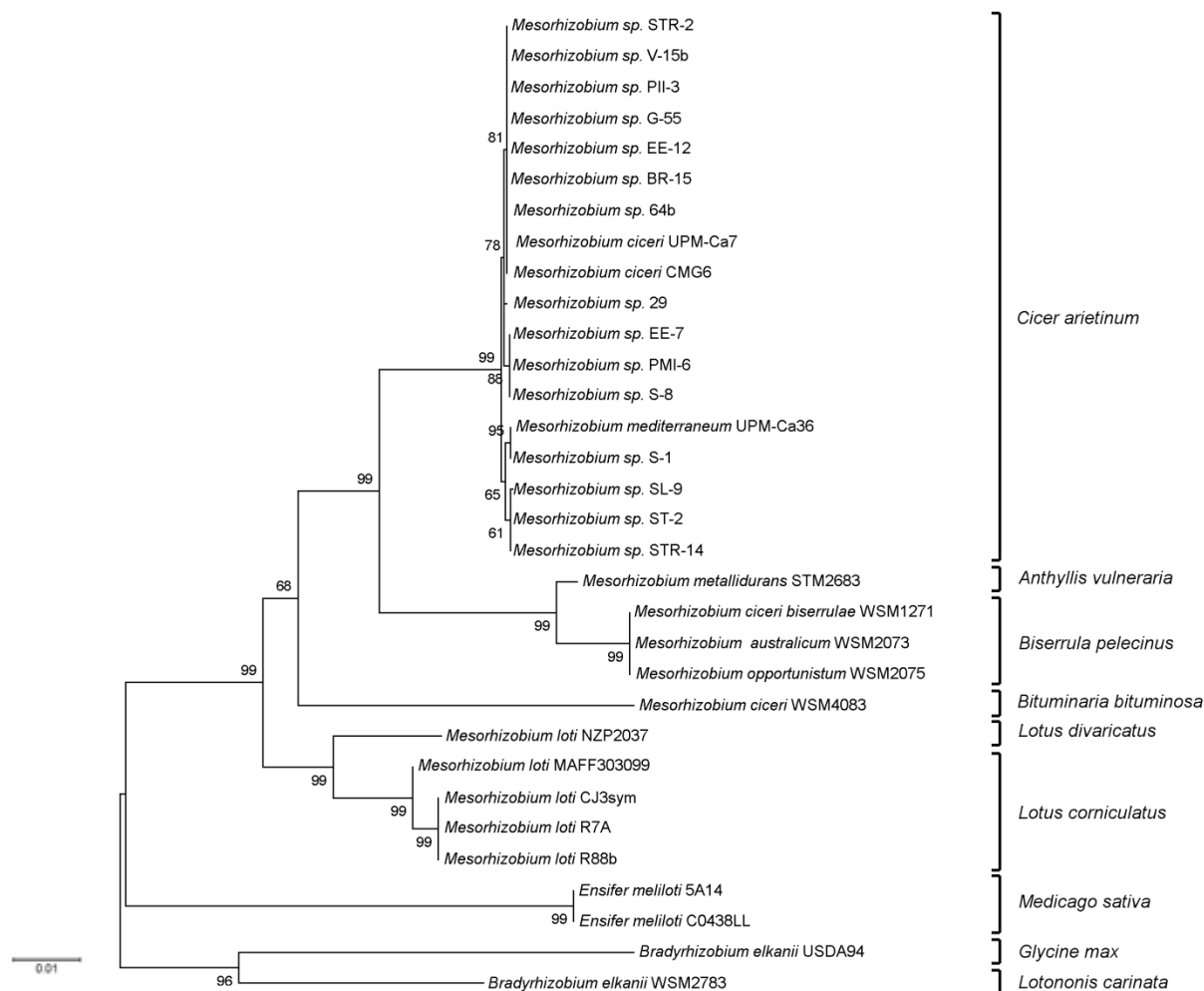


Figura 1. Árvore filogenética *Neighbour-joining*, baseada em seqüências de gene *nodD* de 17 isolados de mesorizóbios noduladores de planta de grão-de-bico e outros rizóbios noduladores de diferentes hospedeiros (918 bp). A escala indica 0.01 substituições entre nucleótidos.

De acordo com a análise filogenética do gene *nodD* (Figura 1), é possível verificar que as estirpes que nodulam o mesmo hospedeiro possuem um gene *nodD* muito conservado. As estirpes cujo genoma foi sequenciado utilizadas neste estudo (Ca36 e CMG6), também agrupam com as estirpes que nodulam *Cicer arietinum* agrupando num único *cluster* com 99% de *bootstrap*.

Também é possível verificar que dentro do grupo das estirpes utilizadas no estudo existem cinco sub-grupos. Um com 81% de *bootstrap*: STR-2, V-15b, PII-3, G-55, EE-12, BR-15, 64b, UPM-Ca7 e CMG6, outro contendo apenas a estirpe *Mesorhizobium sp.* 29, outro com 88% de *bootstrap*: EE-7, PMI-6 e S-8, outro com 95% de *bootstrap*: UPM-Ca36 e S-1 e por fim um grupo com 61% de *bootstrap*: SL-9, ST-2 e STR-14.

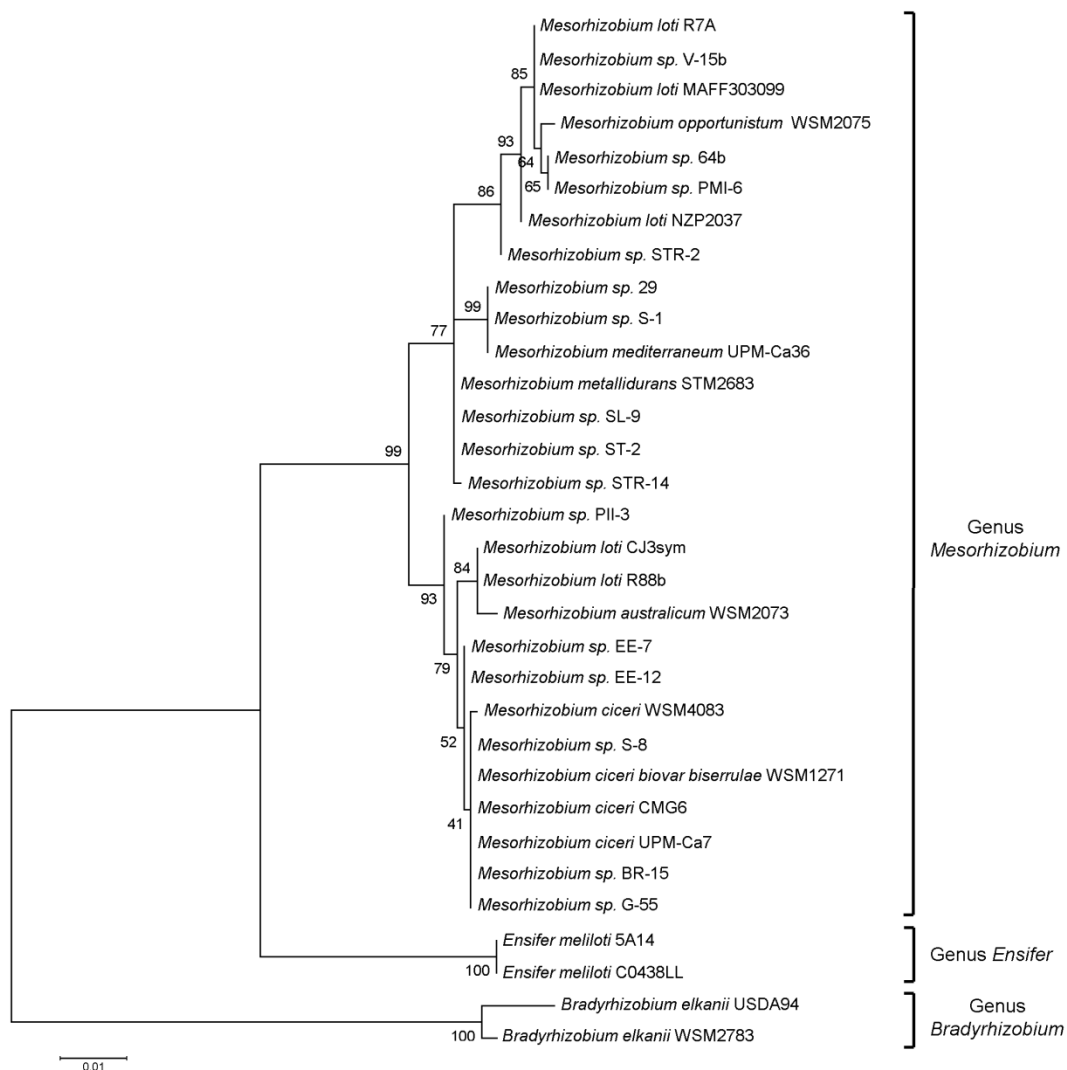


Figura 2. Árvore filogenética *Neighbour-joining*, baseada em seqüências de gene rRNA 16S de 17 isolados de mesorizóbios noduladores de planta de grão-de-bico e outros rizóbios noduladores de diferentes hospedeiros (1370 bp). A escala indica 0.01 substituições entre nucleótidos.

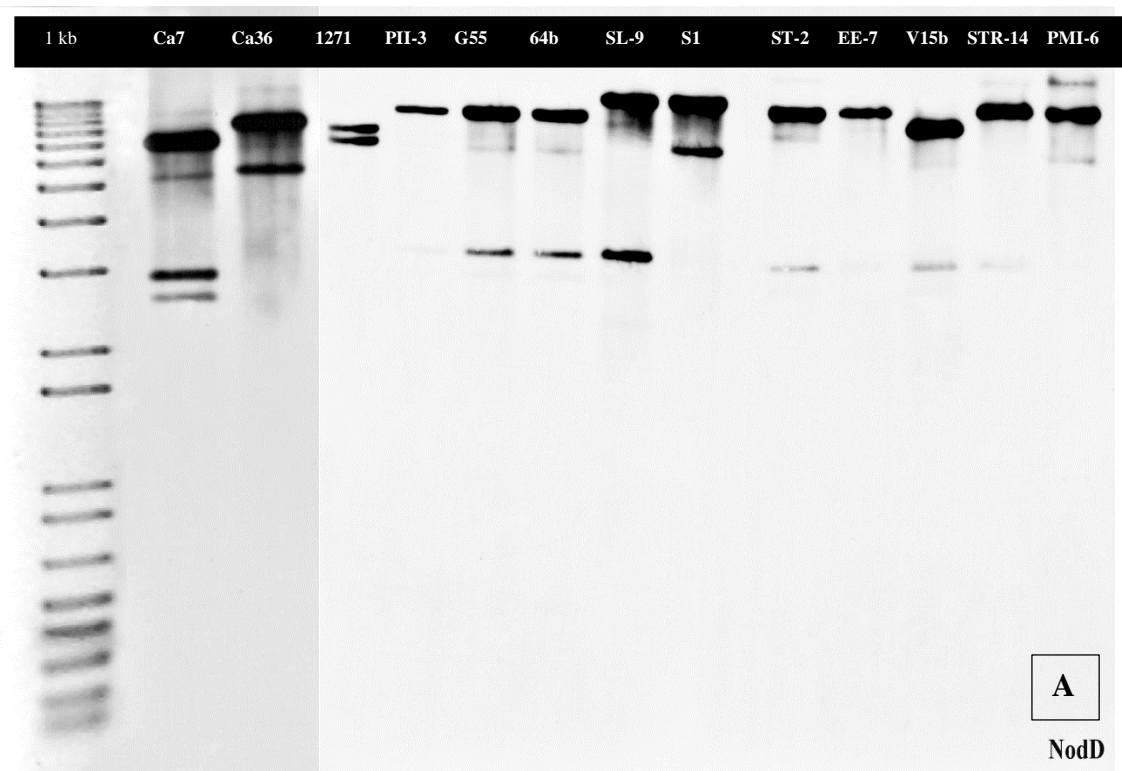
De acordo com a análise filogenética do gene rRNA 16S (Figura 2), é possível observar três agrupamentos formados por espécies de três gêneros diferentes: *Mesorhizobium* com 99% de *bootstrap*, *Ensifer* com 100 % de *bootstrap* e *Bradyrhizobium* com 100% de *bootstrap*. Através da análise filogenética do gene rRNA 16S é possível verificar também que ainda dentro da mesma espécie, as estirpes que possuem hospedeiros diferentes têm seqüências de rRNA 16S idênticas. A filogenia baseada no gene rRNA 16S mostra um agrupamento das estirpes por espécies, o que contrasta com a filogenia baseada no gene *nodD*, que mostra um agrupamento por hospedeiro e independente da espécie.

Comprova-se que o gene rRNA 16S é fiável na análise genética de diferentes espécies de rizóbios mas que não possui grande utilidade no que toca distinguir os simbiosites de diferentes hospedeiros, sendo preferível utilizar a análise genética de genes de simbiose.

3. Deteção do gene *nodD*

A fim de analisar o número de cópias do gene *nodD* procedeu-se a uma análise *Southern*, utilizando o DNA total das 17 estirpes em estudo (Figura 3 A e B).

Foram encontradas múltiplas cópias do gene *nodD* entre as estirpes utilizadas no estudo. A análise demonstrou a presença do gene *nodD* em todas as estirpes e em alguns casos foi detectada uma segunda banda mais fraca que pode ter a ver com o facto de certas estirpes possuírem uma segunda cópia do gene *nodD* (Figura 3 A e B).



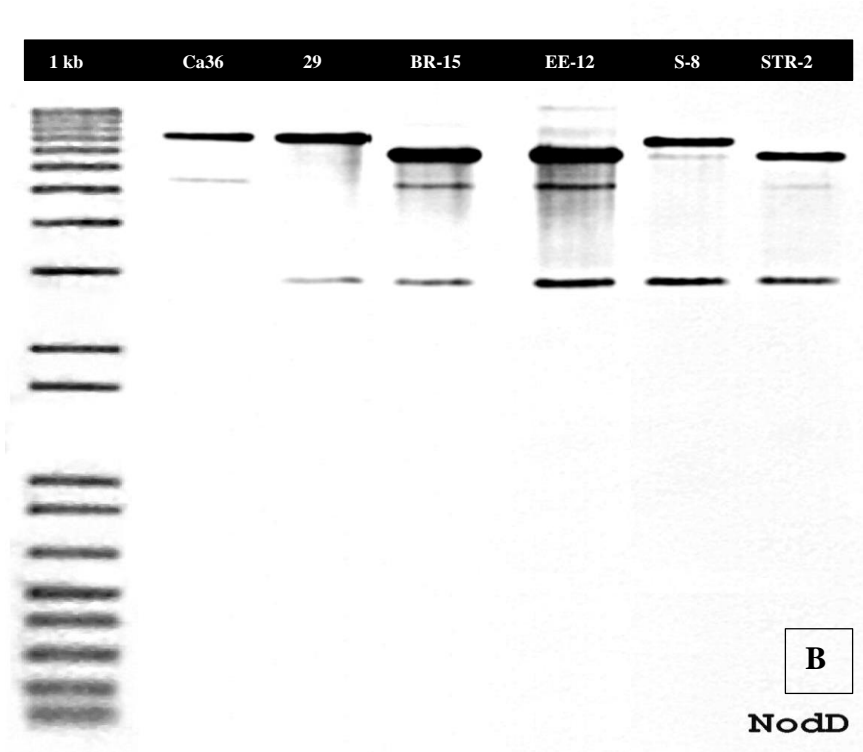


Figura 3. Análise de *Southern blot* do número de cópias e localização do gene *nodD*.

4. Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbio transformadas

4.1. Confirmação da transformação e da expressão do gene *nodD*

Das 17 estirpes em estudo, 5 delas foram transformadas com o plasmídeo pRK415 com uma cópia do gene *nodD* e com o plasmídeo pRK415.

A confirmação das transformações das estirpes V-15b, ST-2, SL-9, PMI-6 e WSM1271 foi feita através de amplificação por PCR do gene *nodD* (resultados não apresentados).

Para confirmar a transcrição do gene *nodD* a partir do plasmídeo pRK*nodD* selecionou-se a estirpe V15b e respectivas estirpes transformadas. A análise da transcrição do gene *nodD* através de RT-PCR semi-quantitativo (Figura 4), indica que, tal como esperado, existe maior quantidade de transcrito do gene na estirpe transformada com pRK*nodD*. O gene rRNA 16S foi utilizado para normalizar a amplificação do gene *nodD*. Os resultados indicam que os níveis de gene *nodD* transcritos são superiores na estirpe V-15b pRK*nodD*, confirmando que a cópia extra deste gene adicionada, está de facto, a ser transcrita.

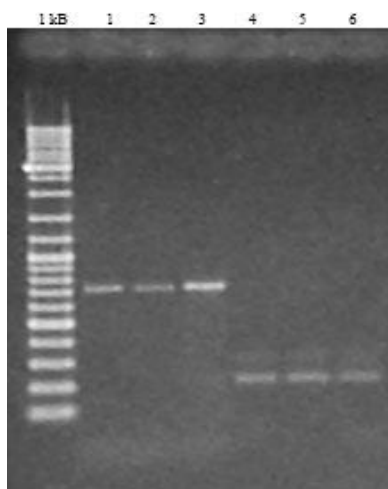


Figura 4. Análise de electroforese de RT-PCR dos genes *nodD* e rRNA 16S do cDNA da estirpe V-15b e respectivas transformadas. Marcador - 1 Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen); Amostras - amplificação do gene *nodD*: 1- V-15b, 2- V-15b pRK415, 3- V-15b pRK*nodD*; amplificação do gene rRNA 16S: 4- V-15b, 5- V-15b pRK415, 6- V-15b pRK*nodD*.

4.2. Curvas de Crescimento

Das 17 estirpes em estudo 5 delas foram transformadas com o plasmídeo pRK415 com uma cópia do gene *nodD* e com o plasmídeo pRK415. Seleccionaram-se as estirpes V-15b, ST-2 e SL-9 tendo em conta a sua eficiência simbiótica (SE), (23%, 4% e 5% respectivamente), e de forma a verificar se com a cópia extra do gene *nodD*, estas estirpes demonstram diferenças fenotípicas significativas, nomeadamente maior capacidade de nodulação. Utilizaram-se assim as estirpes selvagens (V-15b, ST-2 e SL-9), as mesmas estirpes transformadas com o plasmídeo pRK415 (V-15bpRK415, ST-2pRK415 e SL-9pRK415), e transformadas com o plasmídeo pRK415 com a cópia do gene *nodD* (V-15bpRK*nodD*, ST-2pRK*nodD* e SL-9pRK*nodD*).

O crescimento bacteriano foi avaliado através da medição da O.D. (540 nm) das estirpes ao longo de 96 horas utilizando três réplicas de cada estirpe (Fig 5, 6 e 7).

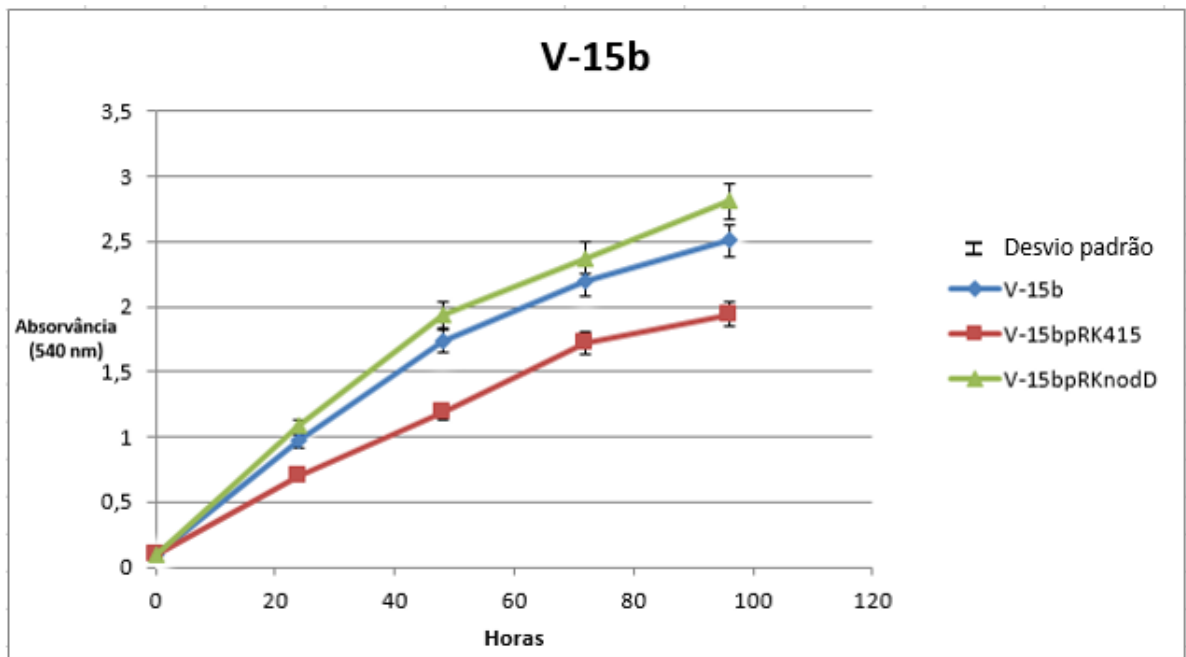


Figura 5. Curva de Crescimento da estirpe V-15b e das respectivas transformadas V-15bpRK415 e V-15bpRKnodD.

A curva de crescimento da estirpe V-15b e das respectivas transformadas (Fig. 5), demonstram uma ligeira diferença entre a estirpe selvagem e a V-15bpRKnodD, o que sugere que a adição do gene *nodD* poderá aumentar a capacidade de crescimento desta estirpe. A estirpe V-15bpRK415 demonstrou uma menor capacidade de crescimento comparada com as outras estirpes.

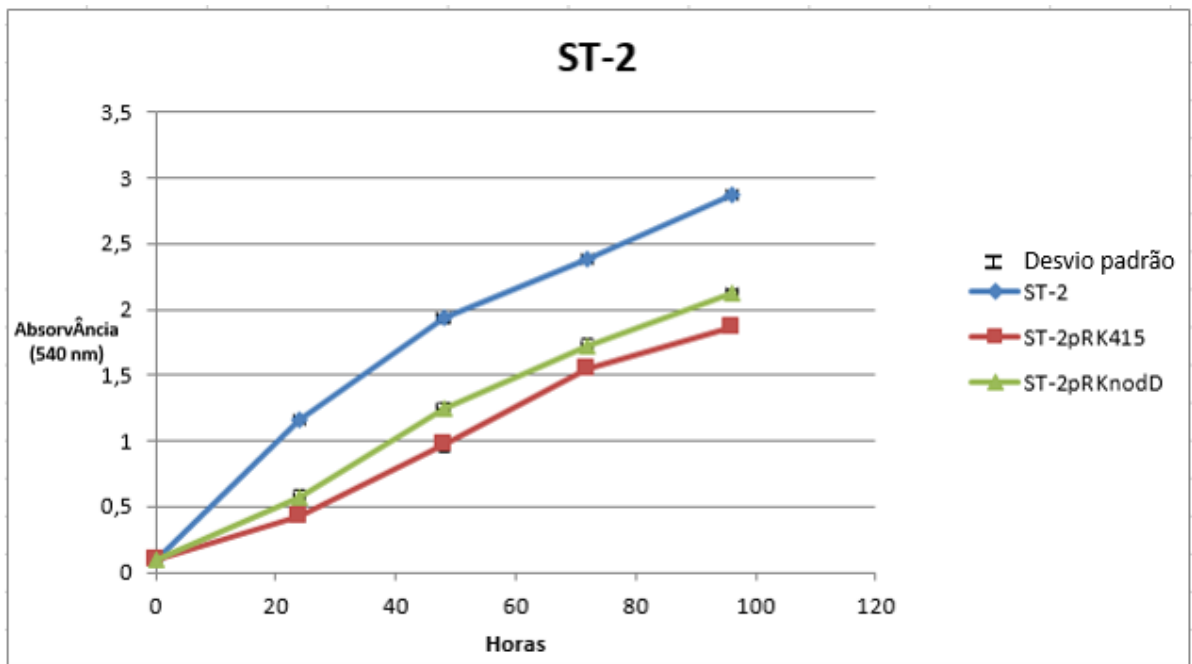


Figura 6. Curva de Crescimento da estirpe ST-2 e das respectivas transformadas ST-2pRK415 e ST-2pRKnodD.

A curva de crescimento da estirpe ST-2 e das respectivas transformadas (Fig. 6) mostra que as estirpes transformadas apresentam um crescimento mais lento quando comparadas com a estirpe selvagem. Este resultado poderá indicar que a presença do vetor pRK415, ainda que possua a cópia do gene *nodD*, afeta a capacidade de crescimento celular. Ainda assim é visível uma ligeira diferença entre o crescimento das estirpes ST-2pRK415 e ST-2pRKnodD, o que poderá indicar que a adição do gene *nodD* de alguma forma melhorou a taxa de crescimento da estirpe ST-2.

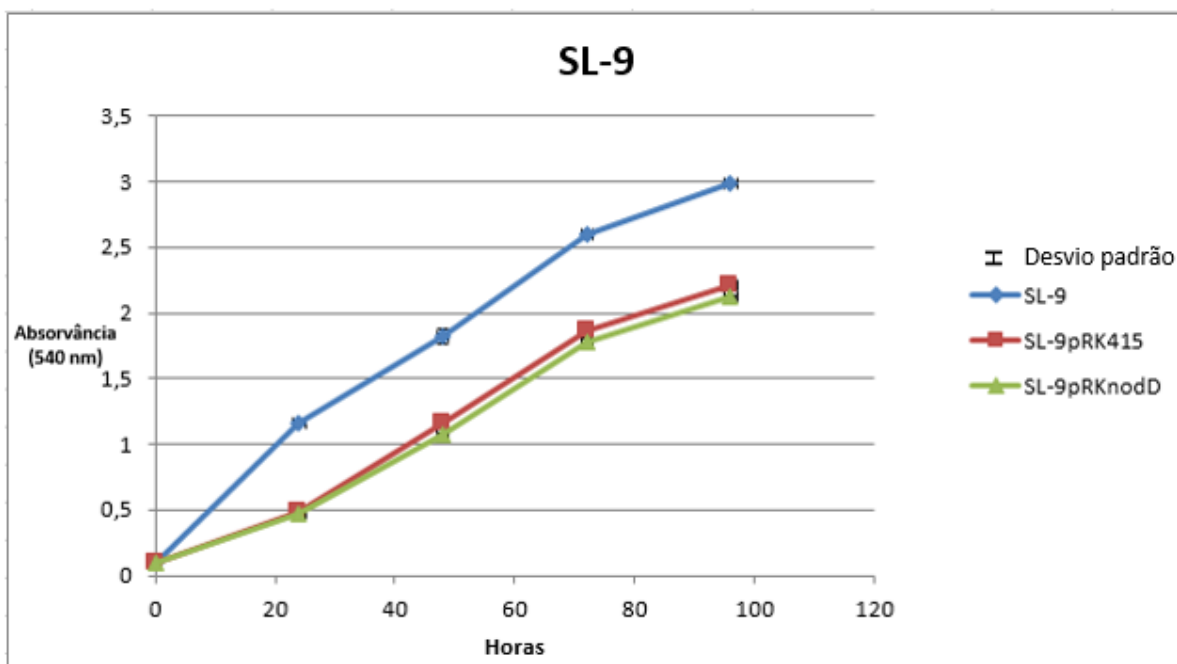


Figura 7. Curva de Crescimento da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas SL-9pRK415 e SL-9pRKnodD.

A curva de crescimento da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas (Fig 7), mostra que as estirpes transformadas apresentam um crescimento mais lento quando comparadas com a estirpe selvagem. Este resultado poderá indicar que a presença do vetor pRK415, ainda que possua a cópia do gene *nodD*, afeta a capacidade de crescimento celular. Não existe grande diferença entre o crescimento das estirpes SL-9pRK415 e SL-9pRKnodD.

4.3. Cinética de nodulação

Os ensaios de crescimento de plantas em hidroponia foram realizados em caixas de hidroponia (Figura 8) nas câmaras de crescimento, através da inoculação de plantas de grão-de-bico com as estirpes de rizóbio selecionadas (V-15b, ST-2 e SL-9), com as respectivas estirpes transformadas com o plasmídeo pRK415 ou pRK*nodD*, a fim de se avaliar se a adição do gene *nodD* poderia resultar em alguma alteração nas cinéticas de nodulação destas estirpes (Fig. 9, 10 e 11).



Figura 8. Caixa de hidroponia.

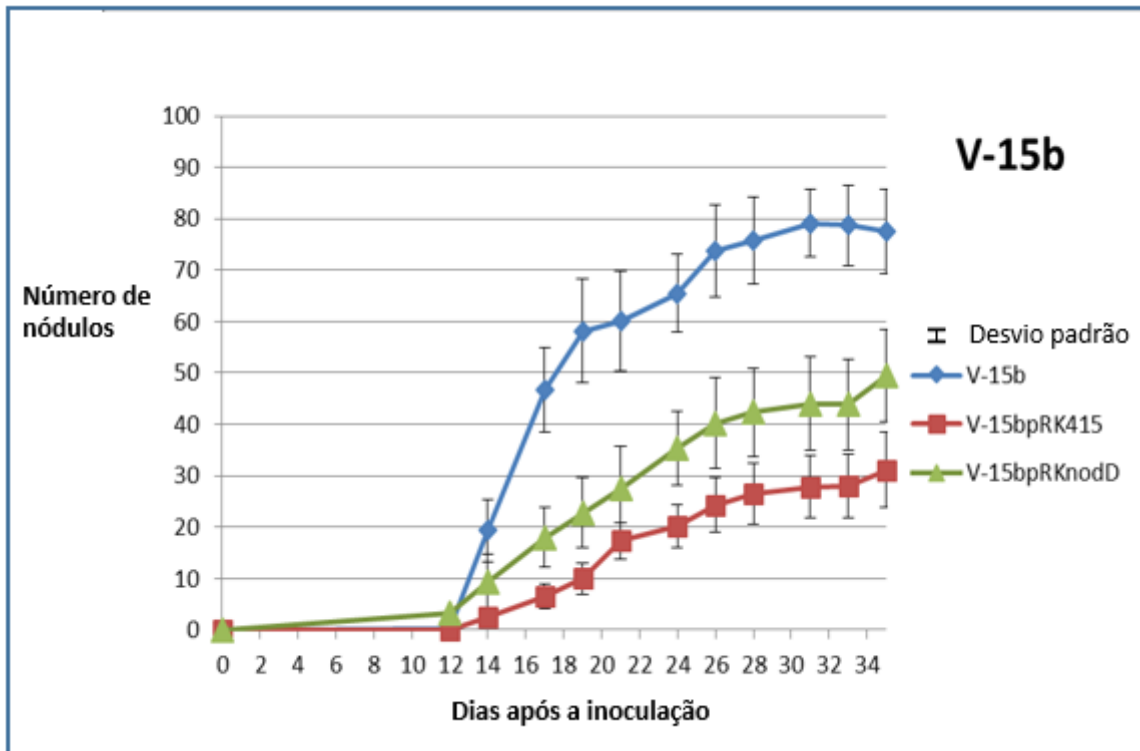


Figura 9. Cinética de nodulação da estirpe V-15b e das respectivas transformadas V-15bpRK415 e V-15bpRKnodD.

A figura 9 apresenta a cinética de nodulação de estirpe V-15b e das respectivas transformações. É possível verificar que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem apresentam sempre um maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com as estirpes transformadas. Este resultado sugere que a presença do vetor pRK415 poderá afetar o desenvolvimento dos nódulos. Ainda assim, registou-se sempre um maior número de nódulos nas plantas inoculadas com V-15bpRKnodD do que nas plantas inoculadas com V-15bpRK415, o que sugere que a cópia extra do gene *nodD* poderá aumentar o número de nódulos produzidos pela estirpe V-15b.

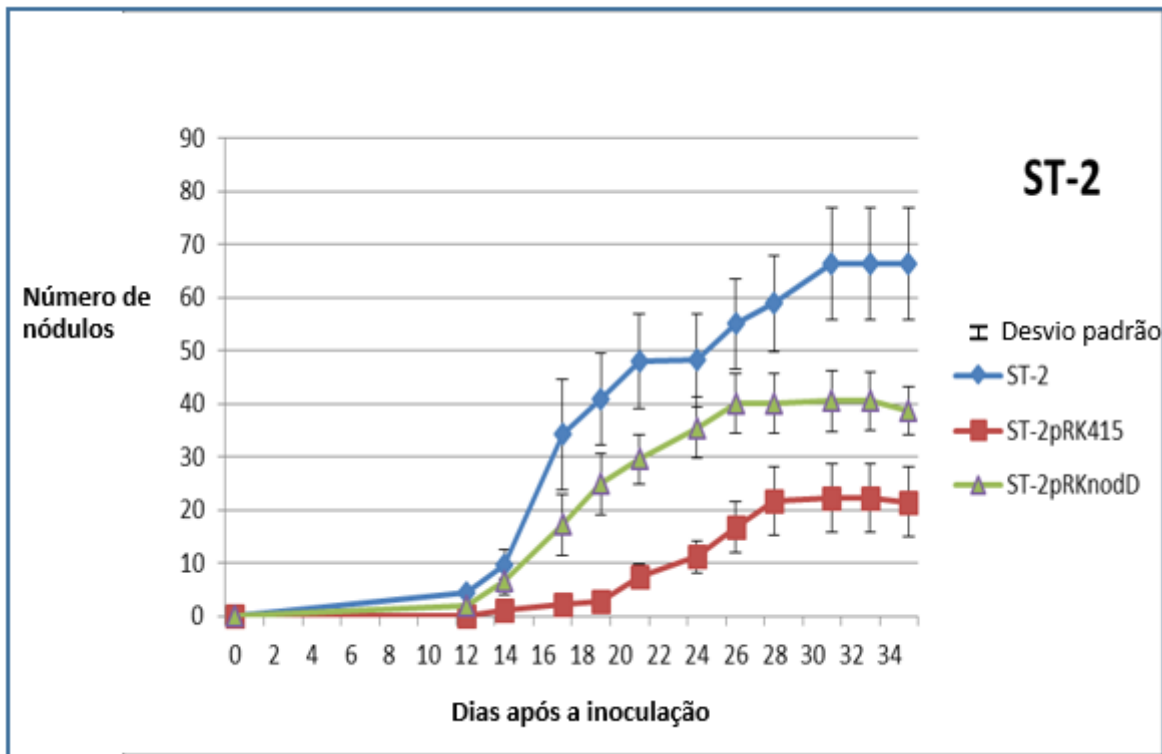


Figura 10. Cinética de nodulação da estirpe ST-2 e das respectivas transformadas ST-2pRK415 e ST-2pRKnodD.

A figura 10 demonstra a cinética de nodulação de estirpe ST-2 e das respectivas transformadas. É possível verificar que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem apresentam um maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com as estirpes transformadas. Este resultado indica que a presença do vetor pRK415 por si poderá afetar o desenvolvimento dos nódulos. No entanto, a partir do dia 14 existe diferença significativa entre o número de nódulos da ST-2pRK415 e da ST-2pRKnodD, o que sugere que a cópia extra do gene *nodD* levou a um aumento do número de nódulos produzidos pela estirpe ST-2.

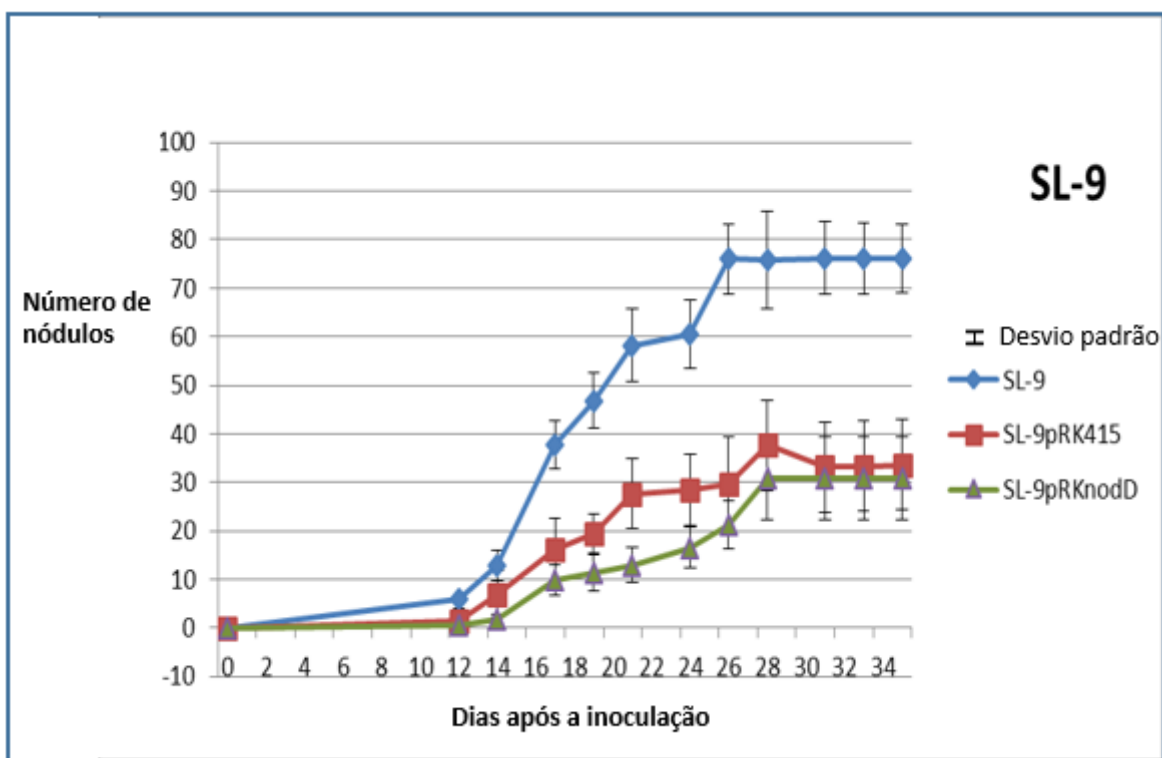


Figura 11. Cinética de nodulação da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas SL-9pRK415 e SL-9pRKnodD.

A figura 11 apresenta a cinética de nodulação da estirpe SL-9 e das respectivas transformadas. É possível verificar que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem apresentam sempre um maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com as estirpes transformadas. Tal indica que a presença do vetor poderá afetar o desenvolvimento dos nódulos. Existe uma diferença entre o número de nódulos produzidos pela SL-9pRK415 e pela SL-9pRKnodD que não é significativa, o que sugere que a cópia extra do gene *nodD* não tem influência no número de nódulos produzidos pela estirpe SL-9.

4.4. Performance simbiótica

Com o objectivo de avaliar o efeito de cópia extra do gene *nodD* na performance simbiótica das estirpes de rizóbio fizeram-se ensaios de crescimento de planta em vasos, em condições controladas em Câmaras de crescimento (Fig. 12), usando as estirpes de grão-de-bico V15b, ST-2, e a estirpe específica de biserrula, *M. ciceri* bv *biserrulae* WSM1271.

No caso da estirpe de biserrula, testou-se a hipótese de a introdução do gene *nodD* proveniente da estirpe *M. mediterraneum* Ca36 (noduladora de grão-de-bico) permitir a esta estirpe passar a nodular grão-de-bico.

Avaliaram-se vários parâmetros das plantas como peso seco da raiz (RDW) (Fig.13), peso seco da parte aérea (SDW) (Fig. 14), peso seco dos nódulos (Fig. 15), número de nódulos (Fig.16) e a eficiência simbiótica (Fig. 17).



Figura 12. Ensaios de crescimento de plantas em vasos de vermiculite com planta de grão-de-bico inoculada com diferentes estirpes de mesorizóbio.

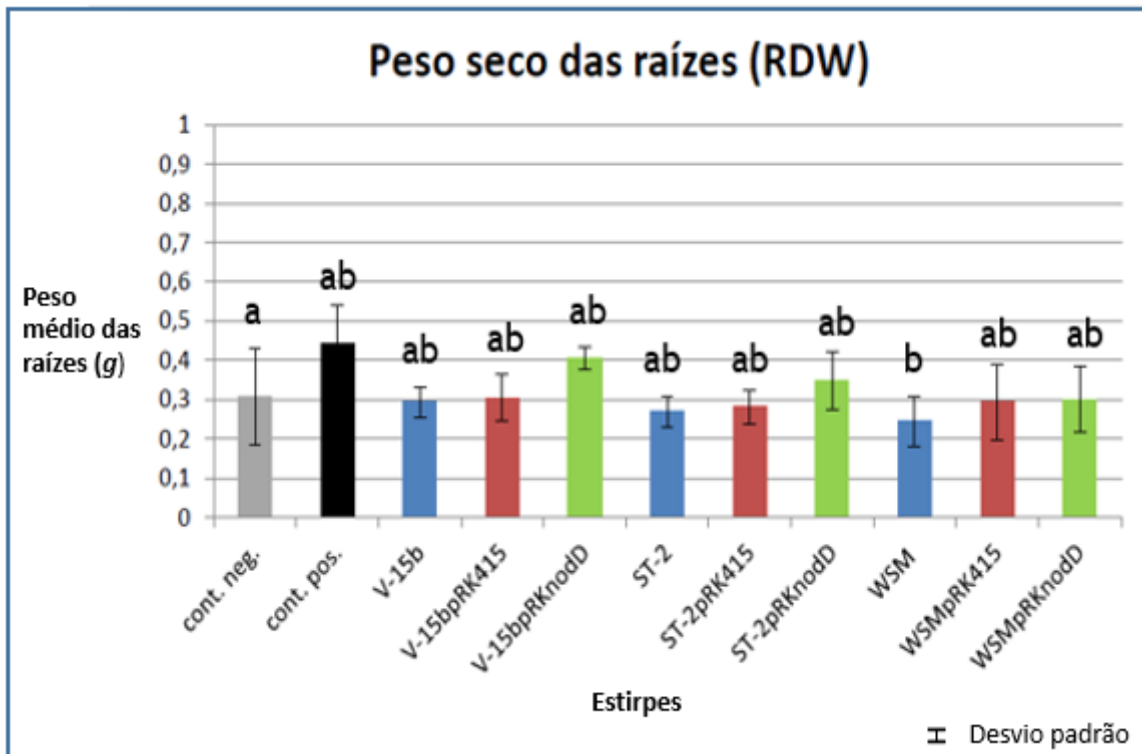


Figura 13. Peso seco das raízes. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

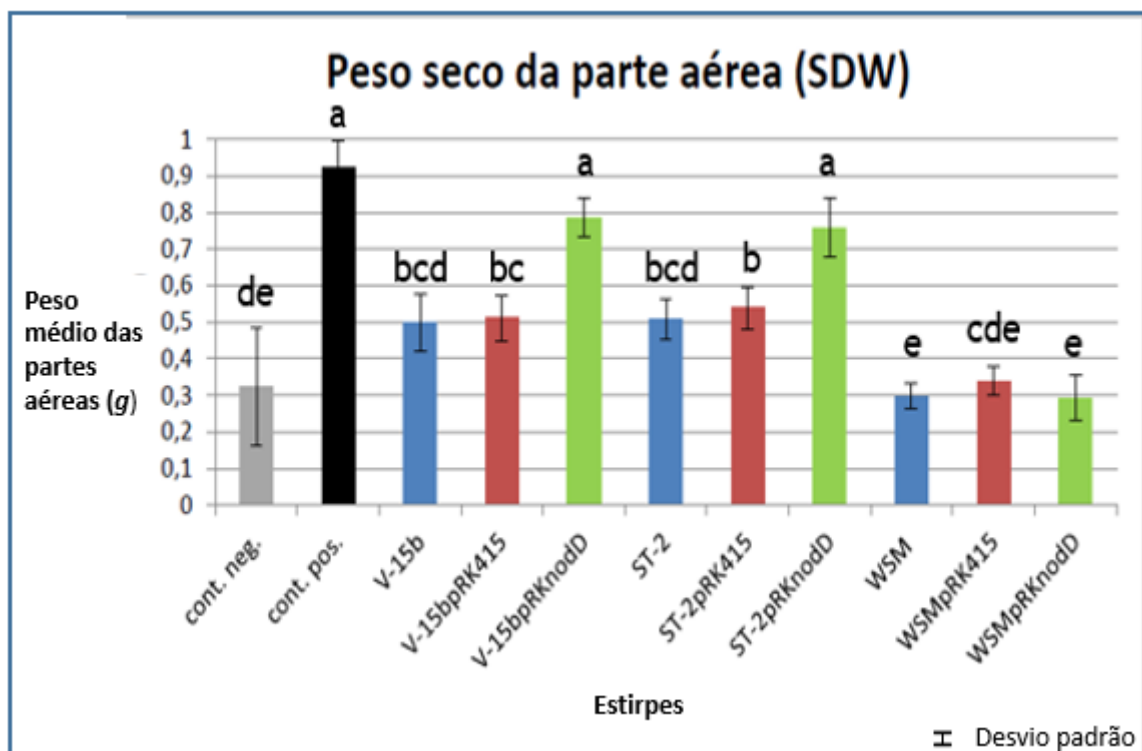


Figura 14. Peso seco da parte aérea. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

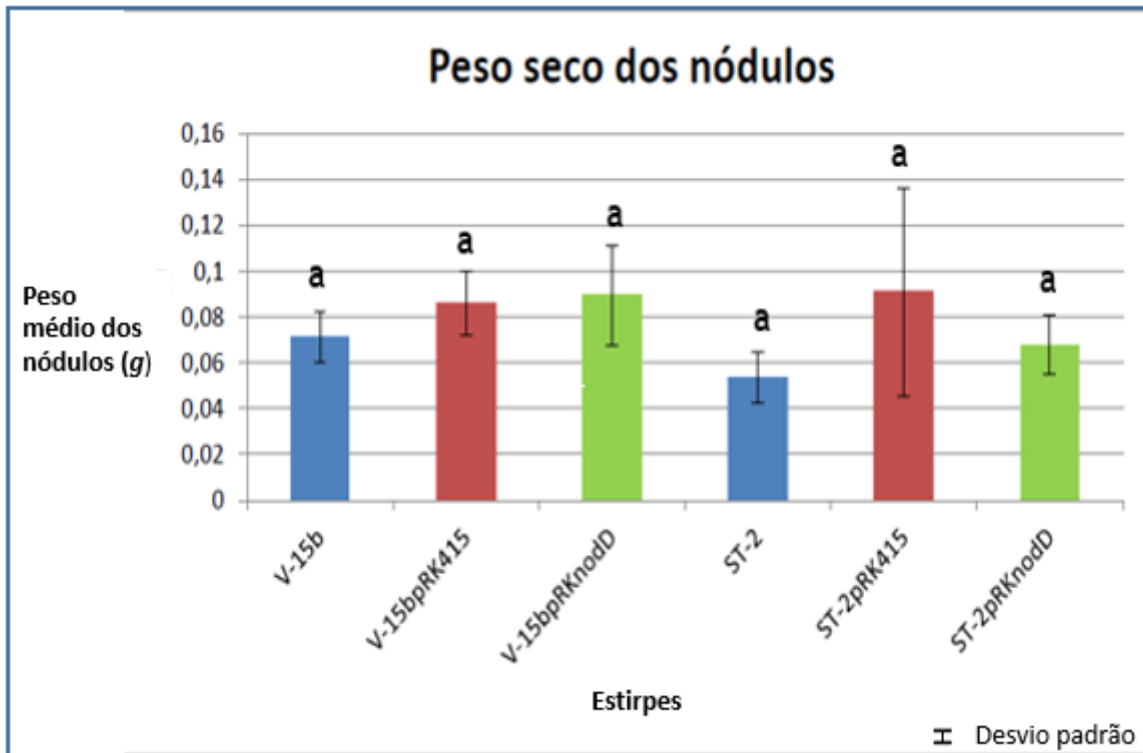


Figura 15. Peso seco dos nódulos. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

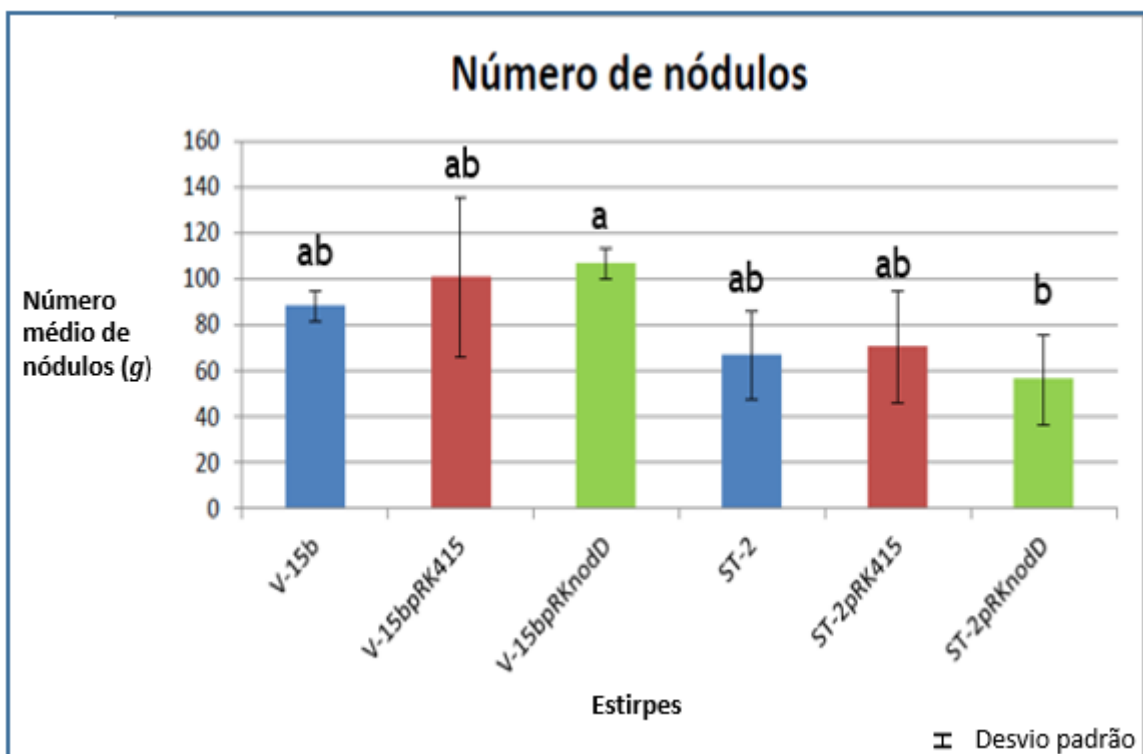


Figura 16. Número de nódulos. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

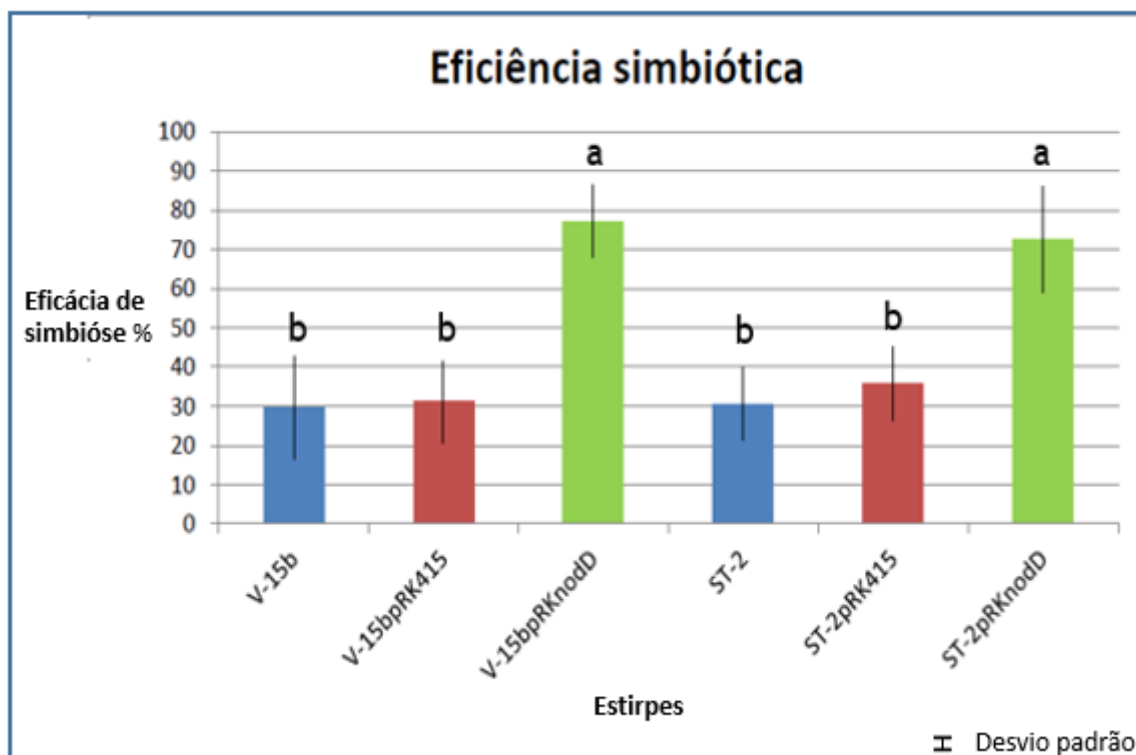


Figura 17. Eficácia simbiótica. Médias e desvios padrões resultantes de 5 réplicas para cada estirpe (excepto estirpe ST-2pRK415 que possui 4 réplicas). ANOVA realizada com um intervalo de confiança de 95%, as letras denotam diferenças estatísticas para $p < 0,05$.

Relativamente aos parâmetros RDW (Fig.13), peso seco dos nódulos (Fig.15), e número de nódulos (Fig.16), não se verificaram diferenças significativas entre as estirpes selvagens e as respectivas transformadas, o que indica que a presença da cópia extra do gene *nodD*, não parece afectar estes parâmetros.

Segundo os resultados obtidos (Fig. 14), através dos ensaios de performance simbiótica das estirpes selvagens e transformadas é possível verificar que as estirpes V-15bpRK*nodD* e ST-2pRK*nodD* demonstraram aumento significativo na produção de biomassa. Verifica-se que não existem diferenças estatísticas significativas entre as estirpes transformadas com a cópia extra do gene *nodD* (V-15b e ST-2) e o controlo positivo, o que significa que a sobre-expressão do gene *nodD* levou a um aumento do SDW, que tornou semelhante ao das plantas suplementadas com azoto. Não foram detectadas diferenças significativas entre as estirpes selvagens e as suas respectivas transformadas com pRK415. No caso da estirpe WSM1271 e das suas transformadas não se obtiveram diferenças significativas na biomassa das plantas, que se deverá ao facto destas não terem sido

noduladas. Ou seja, esta estirpe, originalmente noduladora de biserrula, não adquiriu a capacidade de nodular grão-de-bico através da adição do gene *nodD* de estirpe noduladora de grão.

O peso seco e o número de nódulos formados pelas estirpes V-15b e ST-2 e das suas transformadas, não revelaram diferenças significativas. No entanto, o peso seco da parte aérea (SDW) das plantas inoculadas com V15bpRK*nodD* e ST2pRK*nodD* é significativamente maior que as respectivas estirpes selvagens e com pRK415.

A eficiência simbiótica, que é obtida com base no SDW, variou entre 29 e 77%. Através das análises estatísticas, verifica-se que as estirpes transformadas com pRK415 e as estirpes selvagens não demonstram diferenças significativas entre si, no entanto é possível verificar que existem diferenças estatísticas significativas entre estas estirpes e as estirpes V-15bpRK*nodD* e ST-2pRK*nodD* que revelaram uma eficiência simbiótica muito superior, apresentando valores de 77% e 72% respectivamente. A adição da cópia extra do gene *nodD* permitiu assim um aumento da eficiência simbiótica que, em ambas as estirpes V15b e ST-2, foi próximo de 100%.

Discussão e Conclusões

A relação simbiótica planta leguminosa-rizóbio é altamente específica, apresentando cada estirpe de rizóbio uma gama de hospedeiros particular, cuja especificidade é definida pela troca de sinais entre os rizóbios e as plantas leguminosas que por sua vez irá determinar se o par é ou não compatível (Sharma *et al.* 1993 e Spaink *et al.*, 1998). O regulador transcricional *NodD*, codificado pelo gene *nodD*, é um elemento chave no reconhecimento e sinalização entre hospedeiro e rizóbio (Peck *et al.* 2013). Da análise filogenética das sequências do gene *nodD* (Figura 1), de estirpes que nodulam diferentes hospedeiros, é possível verificar que existe uma maior conservação deste gene nas estirpes que nodulam o mesmo hospedeiro. As estirpes que nodulam a planta de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) por exemplo, formam um grupo com 99% de *bootstrap*, demonstrando o quão conservado é o gene *nodD* dentro das estirpes que nodulam este hospedeiro.

A árvore filogenética baseada nas sequências do gene rRNA 16S, um gene *housekeeping* frequentemente utilizado como marcador filogenético (Alexandre *et al.*, 2008) revela o agrupamento das estirpes de acordo com a sua espécie. A árvore filogenética baseada no gene *nodD* demonstra que, apesar de existirem estirpes que possuem o gene *nodD* muito semelhante, estas podem não pertencer à mesma espécie, o que suporta a ideia de que este gene foi adquirido em diferentes estirpes através de transferência lateral. Resultados semelhantes foram anteriormente reportados para outros genes simbióticos, nomeadamente *nodC* e *nifH* (Laranjo *et al.*, 2008). Nandasena (2009), apresenta um exemplo bem conhecido de transferência lateral de genes simbióticos com as estirpes *Mesorhizobium australicum* WSM2073 e *M. opportunistum* WSM2075, que parecem ter recebido uma ilha simbiótica completa da estirpe *M. ciceri* *bv. biserrulae* WSM1271, adquirindo assim a capacidade de nodular a planta leguminosa *Biserrula pelecinus*.

A análise de *Southern* permitiu verificar a presença de múltiplas cópias do gene *nodD* em algumas estirpes, o que poderá estar relacionado com a elevada eficiência da regulação da expressão deste gene. É frequente encontrar a descrição de estirpes de rizóbios que possuem múltiplas cópias do gene *nodD* (Peck *et al.* 2013, Yeh *et al.*, 2002). As plantas leguminosas produzem os flavonóides como forma de estabelecer a sinalização molecular com os rizóbios, podendo estas favorecer ou inibir a nodulação (Perret *et al.*, 2000). Isto é possível devido ao facto de diferentes proteínas *NodD* poderem interagir com diferentes

flavonóides, alcançando um nível de sinal específico que permite regular a expressão dos genes *nod*. De entre as estirpes estudadas, apenas a *Mesorhizobium sp.* EE-7 demonstrou a presença de uma única cópia do gene *nodD* (Figura 3 (A)).

Das 5 estirpes transformadas com o plasmídeo pRK415 com uma cópia do gene *nodD* (pRK*nodD*), selecionaram-se 3 estirpes tendo em conta a suas eficiências simbióticas (SE) (V-15b (23%), ST-2 (4%) e SL-9 (5%)), de forma a verificar se, com a cópia extra do gene *nodD*, estas estirpes demonstram diferenças fenotípicas significativas, nomeadamente aumento da eficiência simbiótica. Relativamente ao crescimento em meio de cultura, de entre as estirpes transformadas com o gene *nodD*, apenas a V-15bpRK*nodD* demonstrou uma taxa de crescimento superior à da sua respetiva estirpe selvagem (Figura 5), o que sugere que a adição do gene *nodD* poderá aumentar a capacidade de crescimento da estirpe V-15b. A taxa de crescimento da estirpe ST-2pRK*nodD* ainda que não sendo superior à da respetiva estirpe selvagem, é superior à taxa da estirpe ST-2pRK415, sugerindo que a estirpe ST-2 não beneficia da adição do plasmídeo pRK415. No entanto, a presença do gene *nodD* permitiu, de alguma forma, que a sobrecarga proveniente do plasmídeo, fosse aliviada (Figura 6). A adição do gene *nodD* na estirpe SL-9 não demonstrou alterações positivas na taxa de crescimento desta estirpe. Tanto a SL-9pRK415 como a SL-9pRK*nodD* demonstraram taxas de crescimento inferiores à da estirpe selvagem (Figura 7), sugerindo que a adição do plasmídeo pRK415 prejudicou a capacidade de crescimento desta estirpe, ainda que na presença do gene *nodD*.

O estudo da cinética de nodulação, feito a partir da contagem do número de nódulos produzidos por dia, durante 35 dias, pelas estirpes V-15b, ST-2 e SL-9 e respetivas estirpes transformadas, demonstrou que nenhuma das estirpes transformadas com o gene *nodD* apresentou maior capacidade de produção de nódulos do que as estirpes selvagens. No entanto, é de notar que, tanto a estirpe V-15bpRK*nodD* como a ST-2pRK*nodD* demonstraram maior capacidade de nodulação em relação à V-15bpRK415 e ST-2pRK415, respectivamente, (Figuras 9 e 10). Estes resultados podem ser justificados pela possibilidade de a adição do plasmídeo pRK415 representar uma sobrecarga a estas estirpes que as tornou menos eficientes na nodulação. No entanto, a presença da cópia extra do gene *nodD* permitiu atenuar esses efeitos, tal como, aliás, se considerou na análise das curvas de crescimento. Verificou-se também que, à semelhança do ensaio das curvas de crescimento, a estirpe SL-9pRK*nodD* não demonstrou qualquer diferença em relação à SL-9pRK415, apresentando ambas números de nódulos inferiores ao da estirpe selvagem. Ambos os ensaios suportam a

hipótese de que a cópia extra do gene *nodD* não origina diferenças fenotípicas positivas nesta estirpe.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios crescimento em meio líquido e na análise da cinética de nodulação, foi decidido não utilizar a estirpe SL-9 dos ensaios em vaso, para avaliação da performance simbiótica. Por outro lado, de forma a verificar se a sobre-expressão de gene *nodD* heterólogo seria capaz de mudar a gama de hospedeiros de um rizóbio, adicionou-se a este ensaio a estirpe *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* WSM1271, que não possui a capacidade de nodular *Cicer arietinum*, juntamente com as respetivas estirpes transformadas com o plasmídeo pRK415 (WSMpRK415) e com a cópia extra do gene *nodD* (WSMpRK*nodD*).

Com os ensaios de avaliação da performance simbiótica foi possível verificar que as estirpes V-15bpRK*nodD* e ST-2pRK*nodD* apresentaram um grande aumento na produção de biomassa, em particular da parte aérea em relação às estirpes selvagens e às estirpes V-15bpRK415 e ST-2pRK415, respectivamente.

No caso da estirpe WSM 1271 e das suas estirpes transformadas não foi possível verificar diferenças significativas na biomassa das plantas, que se deverá ao facto destas não terem sido noduladas. A estirpe WSM 1271 não nodula grão-de-bico, não tendo sido possível adquirir esta capacidade apenas através da adição do gene *nodD* proveniente de uma estirpe noduladora desta planta. A gama de hospedeiros de um rizóbio é determinada não apenas pelo gene *nodD* mas também por outros factores, nomeadamente outros genes *nod*, responsáveis pela síntese e transporte dos factores Nod, que induzem a infeção em planta específica.

As estirpes V-15b e ST-2 e as suas respetivas transformadas não demonstraram grandes variações no que diz respeito ao número de nódulos formados e ao peso seco destes. No entanto, verificou-se um aumento significativo das partes aéreas das plantas inoculadas com as estirpes V-15bpRK*nodD* e ST-2pRK*nodD*, o que originou valores de eficiência simbiótica de 77% e 72% respectivamente, o que sugere que a adição da cópia extra do gene *nodD* permitiu a estas estirpes um melhoramento nas suas capacidades de simbiose.

Comparativamente, os ensaios de eficiência simbiótica parecem não corresponder aos ensaios de cinética de nodulação, uma vez que o número de nódulos formados pela estirpe V-15bpRK*nodD* foi superior ao da sua estirpe selvagem (Figura 16), o que não se

verificou nos ensaios de cinética. No entanto, este facto pode ser explicado devido ao tempo de duração dos ensaios, pois os ensaios em hidroponia (cinética de nodulação) demoraram 35 dias enquanto os ensaios em vaso (eficiência simbiótica) demoraram 8 semanas. O número de nódulos da estirpe V-15bpRK*nodD* ao fim de 35 dias podia ser inferior à estirpe selvagem devido à sobrecarga da estirpe transformada, mas pode ter alcançado um número maior com o decorrer do tempo, tal como se verifica nos ensaios de eficiência simbiótica (Figura 16).

Em suma, verificou-se que o gene *nodD* é muito conservado dentro das estirpes que nodulam *Cicer arietinum*, apesar de se tratarem de várias espécies diferentes, provavelmente devido à capacidade que os rizóbios têm de transferência lateral de genes, nomeadamente transferência de ilhas simbióticas onde se encontram os genes de simbiose como o *nodD*.

A sobre-expressão do gene *nodD* em estirpes de *Mesorhizobium* noduladoras de *Cicer arietinum* levou a um aumento da eficiência simbiótica das estirpes V-15bpRK*nodD* e ST-2pRK*nodD*.

A sobre-expressão do gene *nodD* heterólogo não foi suficiente para proporcionar à estirpe *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* WSM1271 a capacidade de nodular *Cicer arietinum*, sendo necessários mais estudos relativamente a outros genes de simbiose, nomeadamente genes de nodulação necessários para alterar a gama de hospedeiros dos rizóbios.

Apesar das óbvias vantagens do uso de inoculantes de rizóbio na agricultura para aumentar a produção das colheitas, a engenharia genética de rizóbios com o objectivo de aumentar a sua performance simbiótica tem sido limitada pelo conhecimento insuficiente acerca dos genes que contribuem para uma maior SE. (Laranjo *et al.*, 2006).

Ao contrário de outros géneros, poucas tentativas de modificação genética para melhoramento foram reportadas com estirpes de *Mesorhizobium*. No entanto, algumas modificações com genes não-simbióticos foram bem sucedidas no aumento da tolerância ao stress e/ou na performance simbiótica de mesorizóbios (Laranjo *et al.*, 2014). Por exemplo, a modificação genética de mesorizóbios de grão-de-bico com o gene exógeno *acdS* permitiu aumentar a sua eficiência simbiótica, nomeadamente em condições de stress (Nascimento *et al.*, 2012, Brígido *et al.*, 2013, Nascimento *et al.*, 2012b). Também foi reportada a transformação genética da estirpe *Mesorhizobium ciceri* Rch125 com genes exógenos que

codificam a expressão de trealose, um dissacarídeo que demonstra aumentar a tolerância de estirpes de rizóbio em meios salinos. Foram utilizados os genes *otsA*, *treS* e *treY* de *Sinorhizobium meliloti* 1021 e *otsAB* de *Mesorhizobium loti* MAFF 303099, dos quais se verificou que os genes *otsA* e *otsAB*, apresentaram um aumento da sua expressão na estirpe de *Mesorhizobium ciceri* Rch125 transformada, que está diretamente correlacionada com o aumento da tolerância a meios salinos, apresentando também um aumento da biomassa e do número de nódulos em plantas de grão-de-bico inoculadas e expostas a NaCl (Moussaid *et al.*, 2015).

Tanto quanto sabemos, o presente trabalho descreve a primeira modificação genética de mesorizóbios com genes simbióticos com o objectivo de melhorar a sua performance simbiótica. Dado o incremento da eficiência simbiótica obtido com a adição da cópia extra do gene *nodD*, este trabalho mostra claramente que esta é uma estratégia promissora para a obtenção de rizóbios inoculantes mais eficientes.

Perspetivas Futuras

Este trabalho contribuiu para um aprofundamento do estudo da filogenia molecular do gene *nodD*, permitindo assim obter mais informações sobre a sua evolução e diversidade dentro das várias espécies de *Mesorhizobium*, bem como a sua importância e papel no processo de simbiose.

De futuro poderão ser feitos alguns estudos a partir deste projecto, nomeadamente:

- Análise de SDS-PAGE de forma a verificar a expressão da proteína *NodD*;
- Transformação das restantes estirpes utilizadas no estudo com o gene *nodD*;
- Avaliação da sua eficiência simbiótica;
- Análise da sequência das cópias múltiplas do gene *nodD* identificadas através da análise *Southern*;
- Avaliar a expressão de genes sob o controlo de NodD como *nodABC* entre outros.

Os resultados obtidos neste projeto sugerem que houve um melhoramento ao nível da eficiência simbiótica das estirpes V-15b e ST-2 através da sua transformação com a cópia extra do gene *nodD*. No entanto, a obtenção da capacidade de nodular *Cicer arietinum* por parte da estirpe *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* WSM1271 não foi alcançada com a transformação com *nodD* heterólogo, pelo que, no futuro, será necessário testar a transferência de outros genes envolvidos na especificidade do hospedeiro, como os genes *nodABC*, ou mesmo a transferência de ilha ou plasmídeo simbióticos.

Referências Bibliográficas

- Adams, T. & Chelm, B. (1988) “Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum*”; *Journal of General Microbiology* – 134; pp. 611 – 618;
- Alexandre, A. & Oliveira, S. (2011) “Most heat-tolerant rhizobia show high induction of major chaperone genes upon stress”; *FEMS – Microbiology Ecology* – 75; pp. 28 – 36;
- Alexandre, A., Brigido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S. & Oliveira, S. (2009) “Survey of Chickpea Rhizobia Diversity in Portugal Reveals the Predominance of Species Distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*”; *Microbial Ecology* – 58; pp. 930 – 941;
- Alexandre, A., Laranjo, M., Young, J. & Oliveira, S. (2008) “*dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria”; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* – 58; pp. 2839 – 2849;
- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Carrère, S., Cruveiller, S., Dossat, C., Lajus, A., Marchetti, M., Poinot, V., Rouy, Z., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Barbe, V., Batut, J., Médigue, C. & Masson-Boivin, C. (2008) “Genome sequence of the β -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomic of rhizobia”; *Genome Research* – 18; pp. 1472 – 1483;
- Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A., Schell, M., Bels, L. & Stacey, G. (1988) “Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*”; *Mol. Gen. Genet* – 214; pp. 420 – 424;
- Barriuso, J., Solano, B., Lucas, J., Lobo, A., Villaraco, A. & Mañero, F. (2008) “Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)”; *ResearchGate – Março*; pp. 1 – 17;
- Black, M., Moolhuijzen, P., Chapmans, B., Barrero, R., Howieson, J., Hungria, M. & Bellgard, M. (2012) “The Genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomic of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters”; *Genes* 3; pp. 138 – 166;
- Brígido, C., Alexandre, A. & Oliveira, S. (2012) “Transcriptional analysis of major chaperone genes in salt-tolerant and salt-sensitive mesorhizobia”; *Microbiological Research* – 167; pp. 623 – 629;

- Brígido, C., Nascimento, F. X., Duan, J., Glick, B. R. and Oliveira, S. (2013) "Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Mesorhizobium* spp. reduces the negative effects of salt stress in chickpea" *FEMS Microbiology Letters*, **349**:1, pp. 46-53;
- Broughton, W. & Dilworth, M. (1971) "Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans"; *Biochem. J.*; Vol – 125, Dezembro; pp. 1075 – 1080;
- Burdass, D. (2002) "Rhizobium, Root Nodules & Nitrogen Fixation"; Society for general microbiology; Acedido em: 15 de Fevereiro de 2015 (Link: <http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>);
- Cadahia, E., Leyvar, A. & Ruiz-Argueso, T. (1986) "Indigenys plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.); *Arch. Microbiol.* – Vol. 146; pp. 239 – 244;
- Chen, W., Wang, E., Kuykendall, D. & Genus, I. (2005) "Mesorhizobium"; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – Vol. 2; pp. 403 – 408;
- Chen, W., Yan, G. & Li, J. (1988) "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* – Vol. 38, Nº 4, Outubro; pp. 392 – 397;
- Dean, D., Bolin, J. & Zheng, L. (1993) "Nitrogenase metalloclusters: structures, organisation and synthesis"; *Journal of Bacteriology* – 175; pp. 6737 – 6744;
- Den, G. & Parniske, M. (2009) "The unbearable naivety of legumes in symbiosis"; *Curr. Opin. Plant. Biol.* – 12; pp. 491 – 499;
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. & Kim, C. (1987) The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated; *Journal of Bacteriology* – 169; pp. 3217 – 3223;
- Downie, J. & Young, P. (2001) "Genome sequencing – The ABC of symbiosis"; *Nature* – Vol. 412, Agosto; pp. 297 – 298;
- Dreyfus, B., Garcia, J. & Gillis, M. (1988) "Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*"; *International Journal of Systematic Bacteriology* – Vol. 38, Nº 1, Janeiro; pp. 89 – 98;
- Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. & Young, J. (2001) "Phylogenis of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia"; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – Vol. 51, Novembro; pp. 2037 – 2048;

- Gibson, A. (1987) “Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber”; *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*; pp. 321 – 363;
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangeton, S., Segurens, B., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, S., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C. & Sadowsky, M. (2007) “Legumes Symbioses: Absence of NodGenes in Photosynthetic Bradyrhizobia”; *Science* – Vol. 316, Junho; pp. 1307 – 1312;
- Glick, B. (1995) “The enhancement of plant growth by free-living bacteria”; *Canadian Journal of Microbiology* – 41; pp. 109 – 117;
- Glick, B. (2012) “Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications”; *Artigo de Revisão – Scientifica* – ID: 963401; pp. 1- 15;
- González, V., Santamaria, R., Bustos, P., González, I., Soto, A., Hagelseb, G., Janga, S., Ramírez, M., Jacinto, V., Vides, J. & Dávila, G. (2006) “The partitioned Rhizobium etli genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons”; *PNAS* – Vol. 103, Nº 10, Março; pp. 3834 – 3839;
- Guinel, F. & Geil, R. (2002) “A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of the ethylene in the establishment of these two symbioses”; *Can J. Botany* – 80; pp. 695 – 720;
- Harrison, P., Lower, P., Kim, N. & Young, J. (2010) “Introducing the bacterial ‘chromid’: not a chromosome, not a plasmid”; *Trends in Microbiology* – Vol. 18, Nº 4, Janeiro; pp. 141 – 148;
- Heroven, A. & Dersch, P. (2006) “RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene RovA, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*”; *Mol. Microbiol* – 62; pp.1469 – 1483;
- Honma, M. & Shimomura, T. (1978) “Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid”; *Agr. Biol. Chem.*, Tokyo;
- Hunt, S. & Layzell, D. (1993) Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity”; *Annual Review of Plant Physiology – Plant Molecular Biology* – 44; pp. 483 – 511;

- Jarvis, B., Berkum, P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Marel, J. & Gillis, M. (1997) “Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov.”; International Journal of Systematic Bacteriology – Vol. 47, N° 3, Julho; pp. 895 – 898;
- Jourdan, 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 – Vol. 32, N° 1, Janeiro; pp. 136 – 139;
- Kamboj, D., Bhatia, R., Pathak, D. & Sharma, P. (2010) “Role of *nodD* gene product and flavonoid interactions in induction of nodulation genes in *Mesorhizobium ciceri*”; Physiol. Mol. Biol. Plants – 16(1), Janeiro; pp. 69 – 77;
- Kostiuk, N., Belyakova, M., Leshchenko, D., Miniaev, M., Pretrova, M. & Khartono, E. (2013) “Structural Characterization of the *NodD* Transcription Factor”; American Journal of Bioinformatic Research – (3)3; pp. 35 – 41 ;
- Laranjo, M., Alexandre, A. & Oliveira, S. (2014) “Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus”; Microbiological Research – Vol. 169, Janeiro; pp. 2 -17;
- Laranjo, M., Machado, J., Young, J. & Oliveira, S. (2004) “High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region”; FEMS Microbiol. Ecol. – Vol. 48; pp. 101 – 107;
- Laranjo M, Oliveira S. (2006) “Rhizobial strain improvement: genetic analysis and modification” In: Ray RC, editor. Microbial biotechnology in agriculture and aquaculture, Vol II. Enfield, NH, USA: Science Publisher Inc. pp. 225–60;
- Lavin, M., Herendeen, P. & Wojciechowski, M. (2005) Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary”; Syst Biol – 54; pp. 575 – 594;
- Lindquist, S., Lindberg, F. & Normark, S. (1989) Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* β -lactamase gene”; J. Bacteriol – 171; pp. 3746 – 3753;
- Lynch, J. & Whipps, J. (1991) “Substrate flow in the rhizosphere”; The rhizosphere and plant growth – Kluwer Academic Publishers; pp. 15 – 24;

- Maarten Fauvart & Jan Michiels “Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the Rhizobium-legume symbiosis” *FEMS Microbiol Lett* 285 (2008) pp. 1–9;
- MacLean, A., Finan, T. & Sadowsky, M. (2007) “Genomes of the Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria of Legumes”; *Plant Physiology* – Vol. 144, Junho; pp. 615 – 622;
- McKey, D. (1994) “Legumes and nitrogen: The evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle”; *Advances in legume systematics* – Royal Botanic Gardens, Kew, UK;
- Megaert, P., Van, M. & Holsters, M. (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity”; *Mol. Microbiol* – 25; pp. 811 – 817;
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Masson, C. (2001) “Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria”; *Nature* – Vol. 411, junho; pp. 948 – 950; Macmillan Magazines Ltd;
- Moussaid, S., Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Aurag, J., Berraho E., Sanjuán, J. (2015) “Increased trehalose biosynthesis improves *Mesorhizobium ciceri* growth and symbiosis establishment in saline conditions”; *Symbiosis*; setembro; DOI 10.1007/s13199-015-0338-y;
- Nandasena, K., Hara, G., Tiwari, R., Yates, R., Kishinevsky, B. & Howieson, J. (2004) “Symbiotic relationships and root nodule ultrastructure of the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. – a new legume in agriculture”; *Soil Biology & Biochemistry* – 36; pp. 1309 – 1317;
- Nandasena, K., O’Hara, G., Tiwari, R. & Howieson, J. (2006) “Rapid In Situ Evolution of Nodulating Strains for *Biserrula pelecinus* L. through Lateral Transfer of a Symbiosis Island from the Original *Mesorhizobial* Inoculant”; *Applied and Environmental Microbiology* – Vol. 72, Nº 11m Novembro; pp. 7365 – 7367;
- Nandasena, K., O’Hara, G., Tiwari, R., Willems, A. & Howieson, J. (2007) “*Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae*, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L.”; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* – 57; pp. 1041 – 1045;
- Nandasena, K., O’Hara, G., Tiwari, R., Willems, A. & Howieson, J. (2009) “*Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated

- from *Biserrula pelecinus* L. in Australia”; *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* – 59; pp. 2140 – 2147;
- Nascimento, F., Brígido, C., Alho, L., Glick, B. R. and Oliveira, S. (2012) "Enhanced chickpea growth-promotion ability of a *Mesorhizobium* strain expressing an exogenous ACC deaminase gene". *Plant and Soil*, **353**:1-2; pp. 221-230
 - Nascimento, F., Brígido, C., Glick, B.R., Oliveira, S., Alho, L. (2012b) “*Mesorhizobium ciceri* LMS-1 expressing an exogenous ACC deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints” *Letters in Applied Microbiology*, **55**:1, pp. 15-21.
 - Nascimento, F., Brígido, C., Glick, B. & Oliveira, S. (2012c) “ACC deaminase genes are conserved among *Mesorhizobium* species able to nodulate the same host plant; FEMS - Research Letter;
 - Nour, S., Cleyet-Marel, J., Normand, P. & Fernandez, M. (1995) “Genomic Heterogeneity of Strains Nodulating Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and Description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov.”; *International Journal of Systematic Bacteriology* – Vol. 45, N° 4, Outubro; pp. 640 – 648;
 - Nour, S., Fernandez, M., Normand, P. & Cleyet-Marel, J. (1994) “*Rhizobium ciceri* sp. nov., Consisting of Strains That Nodulate Chickpeas (*Cicer arietinum* L.)”; *International Journal of Systematic Bacteriology* – Vol. 44, N° 3, Julho; pp. 511 – 522;
 - Peck, M., Fisher, R. Bliss, R. & Long, S. (2013) “Isolation and Characterization of Mutant *Sinorhizobium meliloti* *NodD1* Proteins with Altered Responses to Luteolin”; *J. Bacteriol* – Vol. 195, N° 16; pp. 3714 – 3723;
 - Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. (2000) “Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity”; *Microbiology and Molecular Biology Reviews* – Vol. 64, N° 1, Março; pp. 180 – 201;
 - Polcyn, Q. & Lucinski, R. (2003) “Aerobic and anaerobic nitrate and nitrite reduction in free-living cells of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) ; FEMS Microbiology Letters – 226, Agosto; pp. 331 – 337;
 - Pueppke, S. & Broughton, W. (2003) “*Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges”; *Mol. Plant-Microbe. Lett.* – 12; pp. 293 – 318;
 - Rhijin, P. & Vanderleyden, J. (1995) “The *Rhizobium*-Plant Symbiosis”; *Microbiological Reviews* – Março; pp. 124 – 142;

- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. & Martínez-Molina, E. (2001) “A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species”; *Electrophoresis* – Vol. 22; pp. 1086 – 1089;
- Saharan, B. & Nehra, V. (2011) “Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review”; *Life Sciences and Medicine Research* – Volume 2011: LSMR-21;
- Shakilabanu, S., Kanchana, D. & Jayanthi, M. (2012) “Biodiversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr) in Mangrove Ecosystem: A Review”; *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* – 3(3); pp. 418 – 422;
- So, R., Ladha, J. & Young, J. (1994) “Photosynthetic Symbionts of *Aeschynomene* spp. From a Cluster with *Bradyrhizobia* on the Basis of Fatty Acid and rRNA Analyses”; *International Journal of Systematic Bacteriology* – Vol. 44, N° 3, Julho; pp. 392 – 402;
- Spaink, H., Kondorosi, A., Hooykaas P. (1998) “The Rhizobiaceae – Molecular Biology of Model Plant- Associated Bacteria”; Capítulo 20; pp. 387 – 402; Kluwer Academic Publishers;
- Spaink, H., Kondorosi, A., Hooykaas P. (1998) “The Rhizobiaceae – Molecular Biology of Model Plant- Associated Bacteria”; Capítulo 23; pp. 431 – 460; Kluwer Academic Publishers;
- Spaink, P., Wijffelman, A., Pees, E., Okker, R. & Lügtenberg, B. (1987) “*Rhizobium* Nodulation Gene *nodD* as a Determinant of Host Specificity”; *Nature* – 328; pp. 337 – 340;
- Sy, A., Journad, P., Garcia, N., Willems, A., Lajudie, P., Prin, Y., Neryra, M., Gillis, M., Masson, C. & Dreyfus, B. (2001) “Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes”; *Journal of Bacteriology* – Vol. 183, N° 1, Janeiro; pp. 214 – 220;
- Wei, G., Yang, X., Zhang, J., Gao, J., Ma, Y., Fu, Y. & Wang, P. (2007) “Rhizobialide: A New Stearolactone Produces by *Mesorhizobium* sp. CCNWGX022, a Rhizobial Endophyte from *Glycyrrhiza uralensis*”; *Chemistry and Biodiversity* – Vol- 4; pp. 893 – 898;
- Yeh, K., Peck, M. & Long, S. (2002) “Luteolin and GroESL Modulate In Vitro Activity of *NodD*”; *Journal of Bacteriology* – Vol. 184, N° 2, Janeiro; pp. 525 – 530

- Young, J. & Haukka, K. (1996) “Diversity and phylogeny of rhizobia”; *New Phytol* – 133; pp. 87 – 94;
- Young, J., Crossman, L., Johnson, A., Thomson, N., Ghazoui, Z., Hull, K., Wexler, M., Curson, A., Todd, J., Poole, P., Mauchline, T., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Rabinowitz, E., Sanders, M., Simmonds, M., Wgitehead, S. & Parkhill, J. (2006) “The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components”; *Genome Biology* – Vol. 7, N° 4; pp. R34;
- Zahran, H. (1999) “*Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate”; *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* – 63; pp. 968 – 989;

Anexos

Testes ANOVA One Way – Comparações Múltiplas teste de Tukey

RDW

<i>Tabela da Anova</i>					
	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	10	0,174840433	0,017484043	2,540955552	0,016644183
Resíduos	43	0,2958784	0,006880893		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
cont. pos.-cont. neg.	0,1362	-0,042023453	0,314423453	0,282328912
ST-2-cont. neg.	-0,0388	-0,217023453	0,139423453	0,999568215
ST-2pRK415-cont. neg.	-0,0262	-0,215234518	0,162834518	0,999993119
ST-2pRKnodD-cont. neg.	0,0406	-0,137623453	0,218823453	0,999359209
V-15b-cont. neg.	-0,0138	-0,192023453	0,164423453	0,999999976
V-15bpRK415-cont. neg.	-0,004	-0,182223453	0,174223453	1
V-15bpRKnodD-cont. neg.	0,0972	-0,081023453	0,275423453	0,742689938
WSM -cont. neg.	-0,0632	-0,241423453	0,115023453	0,978535296
WSMpRK415-cont. neg.	-0,0136	-0,191823453	0,164623453	0,999999979
WSMpRKnodD-cont. neg.	-0,0072	-0,185423453	0,171023453	1
ST-2-cont. pos.	-0,175	-0,353223453	0,003223453	0,058216901
ST-2pRK415-cont. pos.	-0,1624	-0,351434518	0,026634518	0,151088821
ST-2pRKnodD-cont. pos.	-0,0956	-0,273823453	0,082623453	0,760726703
V-15b-cont. pos.	-0,15	-0,328223453	0,028223453	0,170871343
V-15bpRK415-cont. pos.	-0,1402	-0,318423453	0,038023453	0,245954013
V-15bpRKnodD-cont. pos.	-0,039	-0,217223453	0,139223453	0,999548339
WSM -cont. pos.	-0,1994	-0,377623453	-0,021176547	0,017299912
WSMpRK415-cont. pos.	-0,1498	-0,328023453	0,028423453	0,172207588
WSMpRKnodD-cont. pos.	-0,1434	-0,321623453	0,034823453	0,219251671
ST-2pRK415-ST-2	0,0126	-0,176434518	0,201634518	0,999999994
ST-2pRKnodD-ST-2	0,0794	-0,098823453	0,257623453	0,90721938
V-15b-ST-2	0,025	-0,153223453	0,203223453	0,999992291
V-15bpRK415-ST-2	0,0348	-0,143423453	0,213023453	0,999835651
V-15bpRKnodD-ST-2	0,136	-0,042223453	0,314223453	0,284234062
WSM -ST-2	-0,0244	-0,202623453	0,153823453	0,999993876
WSMpRK415-ST-2	0,0252	-0,153023453	0,203423453	0,999991687
WSMpRKnodD-ST-2	0,0316	-0,146623453	0,209823453	0,999931523
ST-2pRKnodD-ST-2pRK415	0,0668	-0,122234518	0,255834518	0,979057135
V-15b-ST-2pRK415	0,0124	-0,176634518	0,201434518	0,999999995
V-15bpRK415-ST-2pRK415	0,0222	-0,166834518	0,211234518	0,999998586
V-15bpRKnodD-ST-2pRK415	0,1234	-0,065634518	0,312434518	0,505500498
WSM -ST-2pRK415	-0,037	-0,226034518	0,152034518	0,999832054
WSMpRK415-ST-2pRK415	0,0126	-0,176434518	0,201634518	0,999999994
WSMpRKnodD-ST-2pRK415	0,019	-0,170034518	0,208034518	0,999999686

V-15b-ST-2pRKnodD	-0,0544	-0,232623453	0,123823453	0,992907465
V-15bpRK415-ST-2pRKnodD	-0,0446	-0,222823453	0,133623453	0,998572253
V-15bpRKnodD-ST-2pRKnodD	0,0566	-0,121623453	0,234823453	0,990402936
WSM -ST-2pRKnodD	-0,1038	-0,282023453	0,074423453	0,663829442
WSMpRK415-ST-2pRKnodD	-0,0542	-0,232423453	0,124023453	0,993106211
WSMpRKnodD-ST-2pRKnodD	-0,0478	-0,226023453	0,130423453	0,997464241
V-15bpRK415-V-15b	0,0098	-0,168423453	0,188023453	0,999999999
V-15bpRKnodD-V-15b	0,111	-0,067223453	0,289223453	0,5730828
WSM -V-15b	-0,0494	-0,227623453	0,128823453	0,996686507
WSMpRK415-V-15b	0,0002	-0,178023453	0,178423453	1
WSMpRKnodD-V-15b	0,0066	-0,171623453	0,184823453	1
V-15bpRKnodD-V-15bpRK415	0,1012	-0,077023453	0,279423453	0,695624558
WSM -V-15bpRK415	-0,0592	-0,237423453	0,119023453	0,98659057
WSMpRK415-V-15bpRK415	-0,0096	-0,187823453	0,168623453	0,999999999
WSMpRKnodD-V-15bpRK415	-0,0032	-0,181423453	0,175023453	1
WSM -V-15bpRKnodD	-0,1604	-0,338623453	0,017823453	0,111812027
WSMpRK415-V-15bpRKnodD	-0,1108	-0,289023453	0,067423453	0,575625922
WSMpRKnodD-V-15bpRKnodD	-0,1044	-0,282623453	0,073823453	0,65638913
WSMpRK415-WSM	0,0496	-0,128623453	0,227823453	0,996576798
WSMpRKnodD-WSM	0,056	-0,122223453	0,234223453	0,991146584
WSMpRKnodD-WSMpRK415	0,0064	-0,171823453	0,184623453	1

<i>Fator</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
cont. pos.	0,4444	a
V-15bpRKnodD	0,4054	ab
ST-2pRKnodD	0,3488	ab
cont. neg.	0,3082	ab
V-15bpRK415	0,3042	ab
WSMpRKnodD	0,301	ab
WSMpRK415	0,2946	ab
V-15b	0,2944	ab
ST-2pRK415	0,282	ab
ST-2	0,2694	ab
WSM	0,245	b

SDW

Tabela da Anova					
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	10	2,302959976	0,230295998	31,58584029	1,30711E-16
Resíduos	43	0,31351795	0,007291115		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
cont. pos.-cont. neg.	0,5968	0,413340829	0,780259171	3,22498E-12
ST-2-cont. neg.	0,1824	-0,001059171	0,365859171	0,05250385
ST-2pRK415-cont. neg.	0,21375	0,019162164	0,408337836	0,020892285
ST-2pRKnodD-cont. neg.	0,4324	0,248940829	0,615859171	2,46242E-08
V-15b-cont. neg.	0,176	-0,007459171	0,359459171	0,070115697
V-15bpRK415-cont. neg.	0,1858	0,002340829	0,369259171	0,04483867
V-15bpRKnodD-cont. neg.	0,4608	0,277340829	0,644259171	4,51907E-09
WSM -cont. neg.	-0,0268	-0,210259171	0,156659171	0,999988692
WSMpRK415-cont. neg.	0,0142	-0,169259171	0,197659171	0,999999976
WSMpRKnodD-cont. neg.	-0,0322	-0,215659171	0,151259171	0,999937603
ST-2-cont. pos.	-0,4144	-0,597859171	-0,230940829	7,30222E-08
-	-	-	-	-
ST-2pRK415-cont. pos.	0,38305	-0,577637836	-0,188462164	1,89181E-06
ST-2pRKnodD-cont. pos.	-0,1644	-0,347859171	0,019059171	0,115139656
V-15b-cont. pos.	-0,4208	-0,604259171	-0,237340829	4,95647E-08
V-15bpRK415-cont. pos.	-0,411	-0,594459171	-0,227540829	8,97497E-08
V-15bpRKnodD-cont. pos.	-0,136	-0,319459171	0,047459171	0,32279055
WSM -cont. pos.	-0,6236	-0,807059171	-0,440140829	1,64357E-12
WSMpRK415-cont. pos.	-0,5826	-0,766059171	-0,399140829	5,62184E-12
WSMpRKnodD-cont. pos.	-0,629	-0,812459171	-0,445540829	1,51734E-12
ST-2pRK415-ST-2	0,03135	-0,163237836	0,225937836	0,999971717
ST-2pRKnodD-ST-2	0,25	0,066540829	0,433459171	0,001521944
V-15b-ST-2	-0,0064	-0,189859171	0,177059171	1
V-15bpRK415-ST-2	0,0034	-0,180059171	0,186859171	1
V-15bpRKnodD-ST-2	0,2784	0,094940829	0,461859171	0,000290366
WSM -ST-2	-0,2092	-0,392659171	-0,025740829	0,014134557
WSMpRK415-ST-2	-0,1682	-0,351659171	0,015259171	0,098288128
WSMpRKnodD-ST-2	-0,2146	-0,398059171	-0,031140829	0,010669705
ST-2pRKnodD-ST-2pRK415	0,21865	0,024062164	0,413237836	0,016534676
-	-	-	-	-
V-15b-ST-2pRK415	0,03775	-0,232337836	0,156837836	0,999844953
-	-	-	-	-
V-15bpRK415-ST-2pRK415	0,02795	-0,222537836	0,166637836	0,999990355
V-15bpRKnodD-ST-2pRK415	0,24705	0,052462164	0,441637836	0,003973575
-	-	-	-	-
WSM -ST-2pRK415	0,24055	-0,435137836	-0,045962164	0,005558891
-	-	-	-	-
WSMpRK415-ST-2pRK415	0,19955	-0,394137836	-0,004962164	0,040164421
WSMpRKnodD-ST-2pRK415	-	-0,440537836	-0,051362164	0,004207339

	0,24595			
V-15b-ST-2pRKnodD	-0,2564	-0,439859171	-0,072940829	0,001053896
V-15bpRK415-ST-2pRKnodD	-0,2466	-0,430059171	-0,063140829	0,001847057
V-15bpRKnodD-ST-2pRKnodD	0,0284	-0,155059171	0,211859171	0,999980511
WSM -ST-2pRKnodD	-0,4592	-0,642659171	-0,275740829	4,96845E-09
WSMpRK415-ST-2pRKnodD	-0,4182	-0,601659171	-0,234740829	5,80073E-08
WSMpRKnodD-ST-2pRKnodD	-0,4646	-0,648059171	-0,281140829	3,60933E-09
V-15bpRK415-V-15b	0,0098	-0,173659171	0,193259171	0,999999999
V-15bpRKnodD-V-15b	0,2848	0,101340829	0,468259171	0,000198336
WSM -V-15b	-0,2028	-0,386259171	-0,019340829	0,019594443
WSMpRK415-V-15b	-0,1618	-0,345259171	0,021659171	0,127984051
WSMpRKnodD-V-15b	-0,2082	-0,391659171	-0,024740829	0,014881927
V-15bpRKnodD-V-15bpRK415	0,275	0,091540829	0,458459171	0,000355185
WSM -V-15bpRK415	-0,2126	-0,396059171	-0,029140829	0,011847737
WSMpRK415-V-15bpRK415	-0,1716	-0,355059171	0,011859171	0,085009015
WSMpRKnodD-V-15bpRK415	-0,218	-0,401459171	-0,034540829	0,008916257
WSM -V-15bpRKnodD	-0,4876	-0,671059171	-0,304140829	9,36781E-10
WSMpRK415-V-15bpRKnodD	-0,4466	-0,630059171	-0,263140829	1,05144E-08
WSMpRKnodD-V-15bpRKnodD	-0,493	-0,676459171	-0,309540829	6,84652E-10
WSMpRK415-WSM	0,041	-0,142459171	0,224459171	0,999457278
WSMpRKnodD-WSM	-0,0054	-0,188859171	0,178059171	1
WSMpRKnodD-WSMpRK415	-0,0464	-0,229859171	0,137059171	0,998439484

<i>Fator</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
cont. pos.	0,9218	a
V-15bpRKnodD	0,7858	a
ST-2pRKnodD	0,7574	a
ST-2pRK415	0,53875	b
V-15bpRK415	0,5108	bc
ST-2	0,5074	bcd
V-15b	0,501	bcd
WSMpRK415	0,3392	cde
cont. neg.	0,325	de
WSM	0,2982	e
WSMpRKnodD	0,2928	e

Peso dos nódulos

<i>Tabela da Anova</i>					
	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	5	0,0052648	0,00105296	1,788473695	0,15505137
Resíduos	23	0,0135412	0,000588748		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
ST-2pRK415-ST-2	0,0376	-0,012907195	0,088107195	0,230291872
ST-2pRKnodD-ST-2	0,0144	-0,03321864	0,06201864	0,932193827
V-15b-ST-2	0,0182	-0,02941864	0,06581864	0,838919538
V-15bpRK415-ST-2	0,0324	-0,01521864	0,08001864	0,316335651
V-15bpRKnodD-ST-2	0,036	-0,01161864	0,08361864	0,216750295
ST-2pRKnodD-ST-2pRK415	-0,0232	-0,073707195	0,027307195	0,711964945
V-15b-ST-2pRK415	-0,0194	-0,069907195	0,031107195	0,836169862
V-15bpRK415-ST-2pRK415	-0,0052	-0,055707195	0,045307195	0,999492302
V-15bpRKnodD-ST-2pRK415	-0,0016	-0,052107195	0,048907195	0,99999851
V-15b-ST-2pRKnodD	0,0038	-0,04381864	0,05141864	0,999854044
V-15bpRK415-ST-2pRKnodD	0,018	-0,02961864	0,06561864	0,844916138
V-15bpRKnodD-ST-2pRKnodD	0,0216	-0,02601864	0,06921864	0,722293105
V-15bpRK415-V-15b	0,0142	-0,03341864	0,06181864	0,93584239
V-15bpRKnodD-V-15b	0,0178	-0,02981864	0,06541864	0,850800355
V-15bpRKnodD-V-15bpRK415	0,0036	-0,04401864	0,05121864	0,999888147

<i>Fator</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
ST-2pRK415	0,091	a
V-15bpRKnodD	0,0894	a
V-15bpRK415	0,0858	a
V-15b	0,0716	a
ST-2pRKnodD	0,0678	a
ST-2	0,0534	a

Número de nódulos

<i>Tabela da Anova</i>					
	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Fator	5	10079,13793	2015,827586	3,67007318	0,013769026
Resíduos	23	12633	549,2608696		

<i>Níveis</i>	<i>Centro</i>	<i>Limite.Inferior</i>	<i>Limite.Superior</i>	<i>P-valor</i>
ST-2pRK415-ST-2	3,9	-44,88405736	52,68405736	0,999852749
ST-2pRKnodD-ST-2	-10,6	-56,59405036	35,39405036	0,978118997
V-15b-ST-2	21,6	-24,39405036	67,59405036	0,693199851
V-15bpRK415-ST-2	34,2	-11,79405036	80,19405036	0,231340467
V-15bpRKnodD-ST-2	40	-5,994050364	85,99405036	0,113935141
ST-2pRKnodD-ST-2pRK415	-14,5	-63,28405736	34,28405736	0,936670666
V-15b-ST-2pRK415	17,7	-31,08405736	66,48405736	0,865637507
V-15bpRK415-ST-2pRK415	30,3	-18,48405736	79,08405736	0,411794219
V-15bpRKnodD-ST-2pRK415	36,1	-12,68405736	84,88405736	0,235670388
V-15b-ST-2pRKnodD	32,2	-13,79405036	78,19405036	0,28791333
V-15bpRK415-ST-2pRKnodD	44,8	-1,194050364	90,79405036	0,059273499
V-15bpRKnodD-ST-2pRKnodD	50,6	4,605949636	96,59405036	0,025354277
V-15bpRK415-V-15b	12,6	-33,39405036	58,59405036	0,954466808
V-15bpRKnodD-V-15b	18,4	-27,59405036	64,39405036	0,812235443
V-15bpRKnodD-V-15bpRK415	5,8	-40,19405036	51,79405036	0,998647139

<i>Fator</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
V-15bpRKnodD	106,6	a
V-15bpRK415	100,8	ab
V-15b	88,2	ab
ST-2pRK415	70,5	ab
ST-2	66,6	ab
ST-2pRKnodD	56	b

Eficiência simbiótica

Tabela da Anova					
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	8	36325,11227	4540,639034	35,8832807	1,20692E-14
Resíduos	35	4428,869464	126,5391275		

Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor
ST-2pRK415-ST-2	5,253016086	-19,67028251	30,17631468	0,998535751
ST-2pRKnodD-ST-2	41,89008043	18,39216917	65,38799169	3,52191E-05
-	-	-	-	-
V-15b-ST-2	1,072386059	-24,57029732	22,4255252	0,999999989
V-15bpRK415-ST-2	0,569705094	-22,92820616	24,06761635	1
V-15bpRKnodD-ST-2	46,64879357	23,15088231	70,14670482	4,78413E-06
WSM -ST-2	-35,0536193	-58,55153056	-11,55570804	0,00060935
-	-	-	-	-
WSMpRK415-ST-2	28,18364611	-51,68155737	-4,685734855	0,009335415
-	-	-	-	-
WSMpRKnodD-ST-2	35,95844504	-59,4563563	-12,46053378	0,000419652
ST-2pRKnodD-ST-2pRK415	36,63706434	11,71376575	61,56036293	0,000751762
-	-	-	-	-
V-15b-ST-2pRK415	6,325402145	-31,24870074	18,59789645	0,994714262
-	-	-	-	-
V-15bpRK415-ST-2pRK415	4,683310992	-29,60660958	20,2399876	0,999357817
V-15bpRKnodD-ST-2pRK415	41,39577748	16,47247889	66,31907607	0,000116968
-	-	-	-	-
WSM -ST-2pRK415	40,30663539	-65,22993398	-15,3833368	0,000179627
WSMpRK415-ST-2pRK415	-33,4366622	-58,35996079	-8,513363607	0,002545937
-	-	-	-	-
WSMpRKnodD-ST-2pRK415	41,21146113	-66,13475972	-16,28816253	0,000125787
-	-	-	-	-
V-15b-ST-2pRKnodD	42,96246649	-66,46037775	-19,46455523	2,24452E-05
-	-	-	-	-
V-15bpRK415-ST-2pRKnodD	41,32037534	-64,81828659	-17,82246408	4,47399E-05
V-15bpRKnodD-ST-2pRKnodD	4,758713137	-18,73919812	28,25662439	0,998898176
-	-	-	-	-
WSM -ST-2pRKnodD	76,94369973	-100,441611	-53,44578847	3,67069E-11
-	-	-	-	-
WSMpRK415-ST-2pRKnodD	70,07372654	-93,5716378	-46,57581528	4,39261E-10
-	-	-	-	-
WSMpRKnodD-ST-2pRKnodD	77,84852547	-101,3464367	-54,35061421	2,6681E-11
V-15bpRK415-V-15b	1,642091153	-21,85582011	25,14000241	0,999999675
V-15bpRKnodD-V-15b	47,72117962	24,22326837	71,21909088	3,05731E-06
-	-	-	-	-
WSM -V-15b	33,98123324	-57,4791445	-10,48332199	0,000945313
-	-	-	-	-
WSMpRK415-V-15b	27,11126005	-50,60917131	-3,613348796	0,01394729
-	-	-	-	-
WSMpRKnodD-V-15b	34,88605898	-58,38397024	-11,38814772	0,000652772

V-15bpRKnodD-V-15bpRK415	46,07908847	22,58117721	69,57699973	6,07164E-06
WSM -V-15bpRK415	-35,6233244	-59,12123565	-12,12541314	0,00048193
	-			
WSMpRK415-V-15bpRK415	28,75335121	-52,25126246	-5,255439948	0,007516513
	-			
WSMpRKnodD-V-15bpRK415	36,52815013	-60,02606139	-13,03023888	0,000331493
	-			
WSM -V-15bpRKnodD	81,70241287	-105,2003241	-58,20450161	6,95699E-12
	-			
WSMpRK415-V-15bpRKnodD	74,83243968	-98,33035094	-51,33452842	7,77617E-11
	-			
WSMpRKnodD-V-15bpRKnodD	82,60723861	-106,1051499	-59,10932735	5,08027E-12
WSMpRK415-WSM	6,86997319	-16,62793807	30,36788445	0,986681136
	-			
WSMpRKnodD-WSM	0,904825737	-24,402737	22,59308552	0,999999997
	-			
WSMpRKnodD-WSMpRK415	7,774798928	-31,27271019	15,72311233	0,971517485

<i>Fator</i>	<i>Médias</i>	<i>Grupos</i>
V-15bpRKnodD	77,21179625	a
ST-2pRKnodD	72,45308311	a
ST-2pRK415	35,81601877	b
V-15bpRK415	31,13270777	b
ST-2	30,56300268	b
V-15b	29,49061662	b
WSMpRK415	2,379356568	c
	-	
WSM	4,490616622	c
	-	
WSMpRKnodD	5,395442359	c