

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Análise genética e funcional de genes relacionados à captação  
de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii***

**Adriana Ambrosini da Silveira**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientação: Prof. Dra. Luciane M. P. Passaglia**

**Porto Alegre, março de 2009.**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Luciane Passaglia pelos ensinamentos, paciência, amizade e confiança a mim dedicados.

Às Dras. Márcia Margis e Maria Helena Zanettini pelo apoio, disponibilidade e exemplo profissional.

Aos colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos: Anelise Beneduzi, Camila Zanela, Clarisse Palma, Gecele Paggi, Milena Hömrich, Ricardo Weber, Samanta Campos e Sílvia Richter.

À Mariana Colombo pela dedicação empenhada na execução desse trabalho.

A todos demais colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, em especial aos membros do Núcleo de Microbiologia Agrícola: Anelise Beneduzi, Luana Palhares, Mariana Colombo, René Arderius, Roberto Farina e Samanta Campos.

À Eliane Bangel da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO/RS) pelas estirpes de rizóbios.

Ao Dr. Luciano Kayser da FEPAGRO/RS pela atenção dedicada aos estudos sobre sideróforos.

À Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato da UNICAMP pela paciência e empenho na identificação dos sideróforos.

À Hellen Tarasconi e Cecília Nin pela amizade e cumplicidade desde os tempos iniciais da Faculdade de Biologia.

Ao meu namorado Hostílio pelo amor, confiança, carinho e bom humor, que se tornaram fundamentais tanto nessa quanto em outras importantes etapas da minha vida.

À minha família e em especial à minha mãe, Zuleide, pelo amor, dedicação incondicional e exemplo de garra e força de vontade.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pelas excelentes condições de trabalho e inúmeros exemplos profissionais. Em especial ao Elmo e à Ellen pela dedicação, profissionalismo e amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

**Muito obrigada!**

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
AMP	adenosina monofosfato
Å	Angström
ATPase	família de enzimas que catalisam a hidrólise de ATP
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAS	cromo azuroil S, ferro III e CTAB
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
CTAB	brometo de hexadecil trimetil amônio
Da	dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase I	desoxirribonuclease
dNTPs	solução de dATP, dTTP, dCTP e dGTP
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FBN	fixação biológica do nitrogênio
FOR	<i>primer forward</i>
g	grama
GenBank	banco de dados de seqüências gênicas
IPTG	isopropil β-D-tiogalactosídeo
Kb	quilobase
kDa	quilodaltons
KV	quilovolts
L	litro
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LM	meio de cultura Levedura Manitol
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramas
pb	pares de bases
OD	densidade ótica
OMPs	<i>outer membrane proteins</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pMol	picomole
psi	<i>pound force per square inch</i>
rDNA	DNA ribossomal
REV	<i>primer reverse</i>
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
U	unidade
µg	micrograma

μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
UV	luz ultravioleta
V	volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactosídeo

# ANÁLISE GENÉTICA E FUNCIONAL DE GENES RELACIONADOS À CAPTAÇÃO DE SIDERÓFOROS EM *Bradyrhizobium elkanii* \*

Autora: Adriana Ambrosini da Silveira

Orientação: Prof. Dra. Luciane M. P. Passaglia

## RESUMO

Embora o ferro seja um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, somente uma pequena fração está disponível para ser utilizada pelos organismos vivos. A solubilidade do ferro em solos com pH neutro é muito baixa, aproximadamente  $10^{-18}$  M. Em condições de baixa disponibilidade de ferro, diversos microrganismos podem produzir e excretar sideróforos, quelantes orgânicos de baixo peso molecular envolvidos na solubilização e seqüestro de  $Fe^{3+}$ . A captação de ferro é fator limitante para a fixação biológica do nitrogênio, uma vez que esse elemento está diretamente envolvido em moléculas como a nitrogenase, leg-hemoglobina, ferredoxina e citocromos. Enquanto microrganismos de vida-livre, os rizóbios devem ser capazes de solubilizar ferro e competir por ele no solo. As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são de grande relevância agrônômica devido à capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com diversas leguminosas, especialmente a soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *B. japonicum* and *B. elkanii* são duas espécies capazes de nodular soja e quatro estirpes são comumente utilizadas como inoculantes no Brasil: *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 e *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Os genes *fegA* e *fhuA*, relacionados à síntese de proteínas de membrana transportadoras do complexo  $Fe^{3+}$ -sideróforo já foram identificados em *B. japonicum* 61A152 e *Rhizobium leguminosarum*, respectivamente. Ao contrário de *B. japonicum*, nada se conhece sobre esses genes na espécie *B. elkanii*. No presente trabalho foram analisadas a habilidade em produzir sideróforos e a presença de genes relacionados à síntese de proteínas receptoras do complexo  $Fe^{3+}$ -sideróforo entre diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*. Uma porção do gene *fhuA* de *B. elkanii* foi isolada e apresentou um elevado grau de conservação com outros genes relacionados à captação de sideróforos em diferentes bactérias. Experimentos de Southern-*blot* demonstraram que existe apenas uma cópia do gene *fhuA*, e nenhuma do gene *fegA*, no genoma da estirpe SEMIA 587 de *B. elkanii*. Através do tradicional método CAS, a capacidade de produzir e captar sideróforos *in vitro* foi confirmada entre as estirpes de *B. elkanii* utilizadas como inoculantes comerciais no Brasil. As linhagens de *B. japonicum*, entretanto, mesmo possuindo receptores de membrana específicos para sideróforos, não são capazes de se multiplicar em meio de cultura deficiente em ferro. Tais resultados indicam a possibilidade de diferenças significativas quanto ao sistema de captação de ferro entre tais estirpes. Estudos que confirmem a função do gene *fhuA* estão sendo conduzidos para verificação da viabilidade fenotípica de *B. elkanii* mutante para esse gene.

\* Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (97 p.) Março, 2009.

# FUNCTIONAL AND GENETICS ANALYSIS OF SIDEROPHORE-UPTAKE GENES IN *Bradyrhizobium elkanii* \*

Author: Adriana Ambrosini da Silveira  
Adviser: Luciane M. P. Passaglia, Ph. D.

## ABSTRACT

Although iron is one of the most abundant elements in Earth, only one small fraction is available to be used by living organisms. The solubility of iron in soils with neutral pH is very low, approximately  $10^{-18}$  M. During iron deficiency, many microorganisms can produce and excrete low molecular weight organic chelators termed siderophores involved in the solubilization and sequestration of  $Fe^{3+}$ . The iron uptake is a limiting factor for the biological nitrogen fixation as iron is directly involved in many molecules that are essential to this process, like nitrogenase, leg-hemoglobin, ferredoxin and cytochrome. While free-living microorganism, rhizobia should be able to solubilize iron and compete for it in soil. Bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium* are of enormous agricultural value since they are able to fix atmospheric nitrogen in symbiosis with several leguminous plants, especially soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *B. japonicum* and *B. elkanii* strains are two species capable of nodulate soybean, in which four strains are commonly used as inoculant in Brazil: *B. elkanii* SEMIA 587 and SEMIA 5019 and *B. japonicum* SEMIA 5079 and SEMIA 5080. In *B. japonicum* 61A152 and *Rhizobium leguminosarum fegA* and *fhuA* genes, which are involved in the synthesis of membrane  $Fe^{3+}$ -siderophore uptake proteins were already identified, respectively. In the opposite, almost nothing is known about these genes in *B. elkanii* species. In this work the siderophore production ability and the presence of genes related to the membrane  $Fe^{3+}$ -siderophore uptake were analyzed in several *Bradyrhizobium* strains. A *B. elkanii fhuA* DNA region was isolated and it presented a high level of homology with others siderophore uptake related genes from different bacterial species. Southern blot experiments shown that there is a single *fhuA* gene copy in the *B. elkanii* SEMIA 587 genome, and no *fegA* gene was identified in this genome. Through the traditional CAS methodology, the siderophore production and uptake *in vitro* activities were demonstrated in the *B. elkanii* strains used as inoculant in Brazil. *B. japonicum* strains, however, although having siderophores specific membrane receptors, were not able to growth in a medium lacking iron. Such results indicated that significant differences concerning iron uptake system might exist between these two bacterial species. Studies to confirm *fhuA* gene function are under way aiming to verify the phenotypic viability of *B. elkanii fhuA* mutants.

\* Master of Science Dissertation in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetic, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (97 p.) March, 2009.

## SUMÁRIO

	Página
Agradecimentos .....	iii
Abreviaturas .....	iv
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Relação de tabelas .....	x
Relação de figuras .....	xi
1 Introdução .....	1
2 Objetivos .....	13
3 Material e métodos .....	14
3.1 Meios de cultura, soluções e reagentes .....	14
3.2 Plasmídeos e oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) .....	14
3.3 Linhagens bacterianas .....	15
3.4 Análise da produção de sideróforos em placa de Petri .....	16
3.5 Extração de DNA genômico de bradirrizóbios .....	17
3.6 Amplificação em cadeia de fragmentos correspondentes aos genes <i>fegA</i> e <i>fhuA</i> .....	18
3.7 Clonagem de fragmentos dos genes <i>fegA</i> e <i>fhuA</i> obtidos por PCR, extração de plasmídeos e seqüenciamento .....	20
3.8 Hibridização por Southern <i>blot</i> .....	22
3.9 Isolamento de regiões adjacentes ao fragmento amplificado do gene <i>fhuA</i> de <i>B. elkani</i> SEMIA 587 .....	23
3.9.1 Primeira estratégia: Construção de novos <i>primers fhuA</i> .....	24
3.9.2 Segunda estratégia: <i>SiteFinding</i> -PCR .....	26
3.9.3 Terceira estratégia: Construção de uma biblioteca genômica parcial de <i>B. elkani</i> .....	29
3.10 Construção de mutantes nulos de <i>B. elkani</i> SEMIA 587 para o gene <i>fhuA</i> , utilizando-se cassete <i>gfp</i> e cassete <i>gfp/Sm/Sp</i> .....	31
3.10.1 Clivagem de <i>pfhuA587</i> com a enzima de restrição <i>NruI</i> .....	31
3.10.2 Obtenção dos cassetes <i>gfp</i> e <i>Sm/Sp</i> .....	32
3.10.3 Construção de <i>pfhuA587gfp</i> e <i>pfhuA587gfp/Sm/Sp</i> .....	33
3.10.4 Sub-clonagem dos fragmentos <i>fhuA587gfp</i> e <i>fhuA587gfp/Sm/Sp</i> no vetor conjugativo pK19 <i>mobSacB</i> .....	35
3.10.5 Transformação por choque térmico de <i>B. elkani</i> SEMIA 587 utilizando-se as construções pK <i>fhuA587gfp</i> e pK <i>fhuA587gfp/Sm/Sp</i> .....	36

3.10.6	Conjugação triparental utilizando-se as construções pK <i>fhuA587gfp</i> e pK <i>fhuA587gfp/Sm/Sp</i> .....	37
3.11	Metodologia em andamento .....	38
3.11.1	Seleção e análise de colônias de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 contendo a construção pK <i>fhuA587gfp</i> .....	38
3.11.2	Seleção e análise de colônias de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 contendo a construção pK <i>fhuA587gfp/Sm/Sp</i> .....	39
3.11.3	Isolamento e identificação do tipo de sideróforo produzido pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de <i>B. elkanii</i> .....	39
4	Resultados .....	41
4.1	Análise da produção de sideróforos em placa de Petri .....	41
4.2	Isolamento, clonagem e seqüenciamento de fragmentos dos genes <i>fegA</i> e <i>fhuA</i> .....	41
4.3	Hibridização dos genomas de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i> com as sondas correspondentes aos genes <i>fegA</i> e <i>fhuA</i> .....	48
4.4	Estratégias empregadas para o isolamento de regiões adjacentes ao fragmento amplificado do gene <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 .....	49
4.5	Construção de mutantes nulos de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 para o gene <i>fhuA</i> , utilizando-se cassette <i>gfp</i> e cassette <i>gfp/Sm/Sp</i> .....	54
5	Discussão .....	59
6	Considerações finais .....	70
7	Referências bibliográficas .....	71
8	Apêndice .....	79
8.1	Meio Levedura Manitol sólido – LM sólido (pH 6,8) .....	79
8.1.1	Meio Levedura Manitol líquido – LM líquido (pH 6,8) .....	79
8.1.2	Soluções-estoque para meio LM .....	79
8.2	Meio Luria Bertani líquido – LB líquido (pH 7) .....	80
8.2.1	Meio Luria Bertani sólido – LB sólido (pH 7) .....	80
8.3	Corante CAS .....	80
8.4	Meio King-B/Manitol sólido diluído 5X (pH 6,8) .....	80
8.5	Soluções para extração de DNA genômico .....	81
8.6	Tampão TBE 5X .....	81
8.7	Soluções para Extração de DNA plasmidial .....	81

## RELAÇÃO DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1: Vetores utilizados em experimentos de clonagem e plasmídeos recombinantes construídos nesse estudo.....	14
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados nesse estudo.....	15
Tabela 3: Linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo.....	16
Tabela 4: Condições das reações de amplificação utilizadas para PCR <i>SiteFinding</i> .....	28
Tabela 5: Sequências referentes aos plasmídeos <i>pfegA587.2</i> , <i>pfegA587.4</i> , <i>pfegA587.5</i> , <i>pfegA587.6</i> e <i>pfegA587.7</i> e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).	44
Tabela 6: Identidade de nucleotídeos entre as seqüências dos fragmentos correspondentes aos genes <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 com genes relacionados.....	47
Tabela 7: Similaridade e identidade entre as seqüências de aminoácidos derivadas da tradução dos fragmentos correspondentes aos genes <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 com proteínas receptoras de sideróforos relacionadas.....	47
Tabela 8: Sequências referentes aos plasmídeos pNovofhuA587.1, pNovofhuA587.2 e pNovofhuA587.3 e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).....	51
Tabela 9: Sequências referentes aos plasmídeos pSFfhuA587.1 e pSFfhuA587.2 e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).....	52

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Fig. 1: Alinhamento para projeção de <i>primers fhuA</i> .....	20
Fig. 2: Alinhamento para projeção do novo <i>primer fhuA</i> reverso.....	24
Fig. 3: Alinhamento para projeção do novo <i>primer fhuA</i> direto.....	25
Fig. 4: Esquema representativo da técnica de <i>SiteFinding-PCR</i> .....	27
Fig. 5: Região escolhida para projeção do novo <i>primer fhuA</i> reverso maior.....	27
Fig. 6: Fragmento de 434 pb referente ao gene <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e o sítio de restrição da endonuclease <i>NruI</i> .....	32
Fig. 7: Parte da seqüência nucleotídica do plasmídeo pHGWFS7, mostrando os sítios de restrição das enzimas <i>SacII</i> e <i>NruI</i> , utilizadas para a obtenção do cassete <i>gfp</i> .....	33
Fig. 8: Análise da produção de sideróforos por diferentes estirpes de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i> em placa de Petri contendo meio King-B/Manitol (1:5) e corante CAS.....	41
Fig. 9: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com os <i>primers fegA</i> e o genoma de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587, <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 e <i>B. japonicum</i> USDA110.....	42
Fig. 10: Alinhamento entre o fragmento referente ao gene <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 com <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> USDA110 e <i>bll4920</i> de <i>B. japonicum</i> 61A152.....	43
Fig. 11: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR gradiente com os <i>primers fegA</i> e o genoma de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587.....	43
Fig. 12: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com os <i>primers</i> M13/pUC, utilizando-se os DNAs plasmidiais contendo ou não fragmento amplificado com os <i>primers fegA</i> em <i>B. elkanii</i> SEMIA 587.....	44
Fig. 13: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com os <i>primers fhuA</i> e o genoma de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587, <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 e <i>B. japonicum</i> USDA110.....	45
Fig. 14: Alinhamento entre os fragmentos referentes ao gene <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 com a região correspondente ao gene <i>blr4504</i> de <i>B. japonicum</i> USDA110 .....	46
Fig. 15: Alinhamento da seqüência de aminoácidos derivada da tradução do fragmento <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 com parte das proteínas referentes aos genes <i>blr4504</i> de <i>B. japonicum</i> USDA110 e <i>fegA</i> de de <i>B. japonicum</i> 61A152 .....	46
Fig. 16: Auto-radiografia mostrando o padrão de hibridização obtido com as sondas correspondentes a <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 e <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587, com os DNAs genômicos de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587, <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 e <i>B. japonicum</i> USDA110 digeridos com as enzimas de restrição <i>ApaI</i> , <i>HindIII</i> e <i>KpnI</i> .....	49
Fig. 17: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com os <i>primers fhuA</i> REV_novo	

e <i>fhuA</i> FOR_novo, utilizando-se como molde o DNA de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 .....	50
Fig. 18: Gel de agarose mostrando o resultado da clivagem com a enzima <i>EcoRI</i> , dos plasmídeos pNovofhuA587.1, pNovofhuA587.2 e pNovofhuA587.3, contendo produtos de amplificação do DNA genômico de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 com os <i>primers fhuA</i> REV_novo e <i>fhuA</i> FOR_novo. ....	50
Fig. 19: Géis de agarose mostrando os resultados obtidos com a técnica de <i>SiteFinding</i> PCR utilizando-se DNA genômico de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e <i>primers</i> específicos para o gene <i>fhuA</i> ( <i>fhuA</i> REV_novo e <i>fhuA</i> REV_maior).....	51
Fig. 20: Gel de agarose mostrando o resultado da PCR com os <i>primers fhuA</i> REV e <i>fhuA</i> FOR_elk, utilizando-se como molde DNA plasmidial extraído das colônias bacterianas que apresentaram melhores sinais de hibridização nos experimentos relacionados à biblioteca genômica parcial de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587.....	53
Fig. 21: Gel de agarose mostrando o resultado da clivagem com <i>EcoRI</i> , de dez dos dezoito plasmídeos extraídos das colônias bacterianas que apresentaram melhores sinais de hibridização nos experimentos relacionados à biblioteca genômica parcial de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587.....	53
Fig. 22: Gel de agarose mostrando o resultado da clivagem com <i>EcoRI</i> , dos plasmídeos p <i>fhuA587</i> contendo ou não o gene <i>gfp</i> ligado no sítio <i>NruI</i> do fragmento <i>fhuA</i> .....	54
Fig. 23: Parte da seqüência de p <i>fhuA587gfp</i> contendo o início do fragmento <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 e a entrada do gene <i>gfp</i> em fase de leitura correta.....	55
Fig. 24: Gel de agarose mostrando o resultado da clivagem com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> , do plasmídeo p <i>fhuA587gfp</i> contendo cassete <i>Sm/Sp</i> ligado no sítio <i>NruI</i> .....	55
Fig. 25: Parte da seqüência de p <i>fhuA587gfp/Sm/Sp</i> , orientação correta de entrada do cassete e esquema final da construção .....	56
Fig. 26: Gel de agarose mostrando o plasmídeo p <i>KfhuA587gfp</i> clivado com <i>HindIII</i> e <i>EcoRI</i> . ....	57
Fig. 27: Gel de agarose mostrando o plasmídeo p <i>KfhuA587gfp/Sm/Sp</i> clivado com <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>PstI</i> e <i>SalI</i> .....	57

## 1 Introdução

A rizosfera, região do solo imediatamente próxima às raízes, é de fundamental importância para o desenvolvimento vegetal, uma vez que este é o ambiente circundante para a captação de água e nutrientes pelas plantas (Alami *et al.*, 2000). São diversos os tipos de microrganismos encontrados na rizosfera e as associações entre esses e as raízes vegetais podem ser benéficas, nocivas ou neutras para as plantas e, às vezes, o efeito de uma bactéria em particular pode variar como consequência das condições do solo (Lynch, 1990). As bactérias capazes de beneficiar o desenvolvimento das plantas podem ser de dois tipos gerais: existem as que estabelecem uma relação simbiótica com a planta hospedeira e aquelas que vivem livremente no solo, mas que freqüentemente são encontradas perto ou até mesmo dentro das raízes das plantas. As bactérias benéficas de vida livre no solo são geralmente chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR – *plant growth promoting rhizobacteria*) (Antoun *et al.*, 1998; Alami *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2004). O termo PGPR foi adotado por Schroth & Hancock (1982) para descrever bactérias que fossem benéficas e bem adaptadas ao ambiente rizosférico, diferenciando-as daquelas que não o colonizam ou não o fazem tão agressivamente.

Independentemente dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, as PGPRs são um grupo benéfico e heterogêneo de microrganismos que podem ser encontrados na rizosfera, superfície das raízes ou em associação com as mesmas. Porém, alguns autores, como Gray & Smith (2005), incluem os rizóbios entre as PGPRs devido à bem caracterizada simbiose legume-rizóbio. Pode-se caracterizar PGPRs intracelulares – iPGPR (vivem nos espaços entre as células do córtex radicular ou encontram-se em estruturas especializadas, os nódulos) e PGPRs extracelulares – ePGPR (podem colonizar a superfície radicular ou simplesmente viver próximas a ela) (Gray & Smith, 2005).

A promoção do crescimento pode ocorrer direta ou indiretamente (Glick, 1995). Há várias maneiras pelas quais as PGPRs podem afetar de forma direta o desenvolvimento das plantas: através da fixação de nitrogênio atmosférico; da solubilização de minerais, tais como fósforo; da produção de sideróforos (moléculas que solubilizam e seqüestram ferro) ou pela produção de reguladores de crescimento vegetal (hormônios) que acentuam o crescimento vegetal em vários estágios de desenvolvimento (Selosse *et al.*, 2004; Vega, 2007). A promoção indireta de crescimento ocorre quando a bactéria diminui ou impede os

efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos, o que pode ocorrer pela produção de substâncias antagonistas, ou pela indução de resistência a patógenos (Glick, 1995). Antibióticos, por exemplo, decrescem as atividades de microrganismos deletérios, favorecendo, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas (Kloepper, 1993). Dessa forma, a bactéria pode afetar o crescimento vegetal por um ou mais desses mecanismos, assim como utilizar diferentes habilidades para promovê-lo em vários estágios durante o ciclo de vida da planta (Glick *et al.*, 1999).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico são extensivamente estudados devido à importância do nitrogênio, um micronutriente indispensável ao desenvolvimento vegetal e freqüentemente limitante para a produção agrícola. O nitrogênio é um dos principais constituintes das biomoléculas e, em sua forma molecular (N<sub>2</sub>), compõe quase 80% da atmosfera. Apesar de abundante, o nitrogênio do ar é quimicamente inerte e poucos são os organismos capazes de utilizá-lo. A capacidade de fixar nitrogênio é determinada pelo complexo enzimático da nitrogenase e os microrganismos que a possuem são chamados de diazotróficos. A nitrogenase é formada por duas proteínas conservadas e sensíveis ao oxigênio. O componente I ou dinitrogenase é uma proteína ferro-molibdênio composta de quatro subunidades codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*. O componente II ou dinitrogênio redutase é uma proteína ferro-enxofre que contém duas subunidades idênticas, codificadas pelo gene *nifH*. Estas proteínas, juntamente com ATP, Mg<sup>+2</sup> e uma fonte de elétrons são essenciais para a atividade de fixação de nitrogênio (Moat & Foster, 1995).

*nifH* é um dos genes funcionais mais antigos da história da evolução e a análise de suas seqüências em diferentes bactérias é correspondente com a filogenia inferida pelas seqüências do gene do rRNA 16S. Essa característica do gene *nifH* tem possibilitado o estudo da diversidade dos genes de fixação de nitrogênio em bactérias de interesse, bem como a caracterização de tais genes em comunidades microbianas do solo (Rosado *et al.*, 1998). Apesar da variedade de microrganismos capazes de fixar nitrogênio, o complexo da nitrogenase é muito similar na maioria destes. A fixação do nitrogênio atmosférico (FBN; Newton, 2000) conta com representantes cultiváveis em todos os grupos filogenéticos de procariontes (Gram positivos, Gram negativos, Archaea e Cianobactérias). Os microrganismos fixadores de vida-livre obtêm energia de compostos orgânicos do solo (fixação livre) e, os endosimbiontes, utilizam fotossintetizados fornecidos por

determinadas plantas no estabelecimento de relações simbióticas específicas (fixação simbiótica) (Van Loon & Bakker, 2003). A redução do nitrogênio atmosférico à amônia é a base da FBN, processo que requer um gasto energético elevado tanto para os diazotróficos de vida-livre quanto para os simbióticos (Newton, 2000; Yang, 2006).

Entre os diazotróficos endofíticos destacam-se os rizóbios, bactérias que estabelecem simbiose com plantas da família Fabaceae (leguminosas), existindo raras ocorrências de associação a plantas não-leguminosas (Willems, 2007). Os rizóbios são  $\alpha$ -Proteobactérias, um grupo taxonômico que compreende numerosos microrganismos capazes de estabelecer associações intracelulares de contexto patogênico ou simbiótico com eucariontes superiores (Yang, 2006). A família Rhizobiaceae compreende bactérias Gram negativas, quimio-organotróficas, estritamente aeróbias, com um tamanho que varia de 0,5-0,9  $\mu\text{m}$  x 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ , formato de bastonetes não formadores de esporos e mobilidade dada por um flagelo polar único ou dois a seis flagelos peritríqueos (Somasegaram & Hoben, 1994). Normalmente encontrados no solo, os rizóbios são capazes de ali sobreviverem por anos sem o estabelecimento de mutualismo com uma hospedeira leguminosa (Kent & Triplett, 2002). Porém, na presença de um hospedeiro apropriado, interações específicas podem desencadear a infecção bacteriana e a posterior indução de estruturas radiculares especializadas, os nódulos. Dentro dos nódulos ocorrem trocas simbióticas entre a planta e os bacteróides – forma endosimbionte dos rizóbios que é efetivamente capaz de fixar o nitrogênio atmosférico por ação do complexo da nitrogenase (Van Loon & Bakker, 2003).

A FBN é responsável por mais de 60% do nitrogênio fixado disponível (Halbleib & Ludden, 2000; Ludwig & Poole, 2003). Como o nitrogênio é um dos micronutrientes mais limitantes para as culturas em geral, a FBN através da simbiose rizóbio-leguminosa é uma forma barata e eficiente de suprir as necessidades de cultivo (Geurts & Bisseling, 2002). Devido à eficiência da fixação de nitrogênio obtida pela interação rizóbio-leguminosa, muitas espécies de microrganismos são utilizadas como inoculantes – formulações comerciais contendo bactérias capazes de estimular o desenvolvimento vegetal, no cultivo de monoculturas de interesse econômico. Os inoculantes são adicionados à semente ou ao solo durante o plantio (Rebah *et al.*, 2007). A redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados, após início da utilização de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* para a produção de soja no Brasil, é uma

constatação da eficiência da FBN (Alves *et al.*, 2003). Outros exemplos são *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* para lentilha, grão-de-bico e ervilha e *R. tropici* para feijão. Entre os diazotróficos de vida-livre, alguns dos principais microrganismos promotores de crescimento de plantas estão entre os gêneros *Azoarcus*, *Arthrobacter*, *Gluconacetobacter*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Paenibacillus* (Reiter *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 2004). A inoculação com bactérias diazotróficas apropriadas supre totalmente a necessidade de adubação nitrogenada nas lavouras, gerando uma economia de pelo menos R\$ 2,87 bilhões anuais (Menna *et al.*, 2006) e eliminando os danos ambientais causados pela fertilização química.

A “troca de sinais” entre planta e bactéria confere especificidade de hospedeiro e é um aspecto proeminente para a formação de nódulos nas raízes (Long, 1996; Broughton & Perret, 1999). *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992), *B. japonicum* (Jordan, 1982) e *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) fixam nitrogênio em simbiose com a soja [*Glycine max* (L.) Merril]. No Brasil, estirpes das espécies *B. elkanii* e *B. japonicum* são utilizadas como inoculantes comerciais no plantio (Peres & Vidor, 1980; Alberton *et al.*, 2006). Desde 1992, são quatro as linhagens autorizadas para uso em inoculantes: *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 e *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 – de acordo com a Coleção de Cultura de *Rhizobium* da Seção de Microbiologia Agrícola da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), instituição pública responsável pela manutenção e distribuição das estirpes utilizadas comercialmente no país. A estirpe *B. japonicum* USDA110 é utilizada comercialmente em culturas de soja de países como os Estados Unidos e Canadá (Boiero *et al.*, 2007) e é a única linhagem de bradirrizóbio que teve seu genoma seqüenciado.

O sucesso da inoculação com rizóbios depende, em parte, da capacidade de permanência das estirpes introduzidas no solo. Uma característica importante dos rizóbios introduzidos é a capacidade de competir com outros rizóbios e microrganismos nativos, quando estes estão presentes no solo em densidades altas (Triplett & Sadowsky, 1992; Castro *et al.*, 2000). Em termos de relação microbiana, a motilidade, a produção de polissacarídeos, a produção de bacteriocinas e a captação de ferro via sideróforo (do grego *sideros* = ferro, *foros* = transportador), são exemplos de características competitivas importantes (Tas *et al.*, 1995). Embora o ferro seja o segundo metal (após o alumínio) e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, apenas uma pequena fração está

disponível para ser utilizado pelos seres vivos. Em solos aerados e com pH neutro, sua solubilidade é muito baixa ( $10^{-18}$  M) devido à predominância de  $\text{Fe}^{3+}$  encontrado na forma de hidróxidos insolúveis de composição geral  $\text{FeOOH}$  (Lindsay & Schwab, 1982; Neilands, 1991, 1995; Chipperfield & Ratledge, 2000).

Devido à alta capacidade de aceitar e doar elétrons prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica e ferrosa, o ferro integra diversas metaloproteínas atuando como centro catalítico ou carreador de elétrons (Krewulak & Vogel, 2007). Diversos processos celulares vitais como o transporte de elétrons, a redução de oxigênio durante a síntese de ATP, a fotossíntese e a síntese de aminoácidos, nucleosídeos e DNA, são dependentes de ferro (Ratledge & Dover, 2000; Benite *et al.*, 2002). Dessa forma, o ferro é um elemento limitante para o crescimento de praticamente todas formas de vida. Em geral, as concentrações mínimas de ferro requeridas para o crescimento normal das plantas são de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M e, para muitos microrganismos, de aproximadamente  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M (Andrews *et al.*, 2003). Raras exceções como os lactobacilos, por exemplo, desenvolveram mecanismos para suprir a carência nutricional de ferro através do uso de manganês e cobalto (Krewulak & Vogel, 2007).

Os microrganismos podem empregar uma variedade de estratégias para a aquisição direta de ferro em ambientes com baixa disponibilidade desse elemento. Bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Helicobacter pylori*, entre outras, são capazes de reduzir o íon férrico a íon ferroso por redutases extracelulares e transportar  $\text{Fe}^{2+}$  pela membrana externa através de porinas; o transporte de  $\text{Fe}^{2+}$  através da membrana citoplasmática ocorre pelo chamado sistema Feo (dependente de ATP). O transporte de  $\text{Fe}^{2+}$  através do sistema Feo também ocorre entre várias bactérias sob condições anaeróbias, onde há um predomínio de íon ferroso ao invés de íon férrico (Andrews *et al.*, 2003). Algumas bactérias patogênicas, como por exemplo, *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, também são capazes de seqüestrar  $\text{Fe}^{3+}$  complexado a moléculas relacionadas ao transporte (transferina) e proteção contra toxicidade de ferro (transferina e lactoferrina) no organismo (Cornelissen, 2003).

Outro recurso de ferro é a utilização direta de moléculas contendo grupamentos heme, os quais contém um átomo de ferro contido no centro de um grande anel orgânico heterocíclico chamado porfirina. Heme é um grupo prostético constituinte de diversas enzimas tais como hemoglobina (localizada nas células sanguíneas vermelhas) e leg-

hemoglobina (encontrada na zona central dos nódulos em leguminosas), ambas relacionadas ao transporte e difusão de oxigênio. O heme é altamente tóxico por ser uma molécula hidrofóbica capaz de realizar reações redox não enzimáticas, sendo, portanto, raramente dissociado das proteínas das quais ele faz parte. A capacidade do uso da leg-hemoglobina como fonte de ferro em condições de baixa concentração desse metal, por exemplo, já foi descrita entre alguns rizóbios como *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Noya *et al.*, 1997; Nienaber *et al.* 2001). A capacidade de incorporar grupamentos heme também pode ser realizada de forma indireta através da utilização de hemóforos (ligantes extracelulares de hemes), processo dependente de proteínas específicas de membrana externa, de sistemas transdutores de energia (TonB) e de transporte [ABC (ATP-Binding-Cassette)]. A utilização de hemóforos já foi caracterizada, por exemplo, em *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Yersinia pestis* e *Y. enterocolitica* (Wandersman & Delepelaire, 2004).

Entre as estratégias utilizadas para a aquisição de ferro, a produção de sideróforos aparece como a mais comumente empregada (Ferguson & Deisenhofer, 2002) e, conseqüentemente, melhor definida até o momento (Krewulak & Vogel, 2007). Sideróforos são metabólitos secundários altamente eletronegativos e de alta afinidade por  $Fe^{3+}$ , sendo produzidos por diversos microrganismos sob condições de indisponibilidade de ferro no ambiente. A maioria das bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e fungos produz sideróforos quando se multiplica em ambientes com baixa concentração de ferro (Carrilo & Vazquez, 1992; Neilands, 1993, 1995). Tal característica também pode ser encontrada entre algumas espécies de algas e plantas; para plantas os quelantes de ferro são chamados de fito-sideróforos (Benite *et al.*, 2002).

Existem cerca de 500 compostos, com distintas estruturas, já identificados como sideróforos (Boukhalfa & Crumbliss, 2002), entretanto, a natureza dos grupos funcionais que coordenam a solubilização de  $Fe^{3+}$  não difere muito entre eles (Krewulak & Vogel, 2007). A caracterização do tipo de sideróforo utilizado pode ser feita por identificação do grupo funcional utilizado como ferro-ligante: hidroxamatos (e.g. aerobactina e ferricromo), catecolatos (e.g. enterobactina) e hidroxicarboxilatos (e.g. fioquelina) (Wandersman & Delepelaire, 2004; Krewulak & Vogel, 2007). Após ser secretado para o ambiente externo, o sideróforo solubiliza o íon férrico formando o complexo  $Fe^{3+}$ -sideróforo, que é transportado de volta à célula para disponibilização do

metal ao microrganismo. Algumas vezes o sideróforo é reciclado, podendo ser re-utilizado para a mesma função (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Alguns microrganismos são capazes de captar sideróforos exógenos, não produzidos por eles próprios, desde que possuam proteínas de membrana específicas para tal: fato chamado de sinergismo interestirpe. Mesmo que exista uma clara vantagem competitiva em produzir sideróforos, os microrganismos que possuem a capacidade de apenas utilizá-los também são beneficiados (Neilands, 1993; Wandersman & Delepelaire, 2004). *P. aeruginosa*, por exemplo, sintetiza e usa dois sideróforos próprios, mas também possui a capacidade de utilizar sideróforos bacterianos heterólogos (Jurkevitch *et al.*, 1992). *B. japonicum* 61A152 produz citrato férrico como sideróforo (Guerinot *et al.*, 1990), mas também é capaz de utilizar ferricromo, um sideróforo derivado de fungos (LeVier & Guerinot, 1996; Benson *et al.* 2005).

Os sideróforos variam muito em estrutura e não existe um procedimento único para determinar sua identificação e produção entre os microrganismos. Podem-se utilizar métodos químicos, microbiológicos e moleculares para a detecção e caracterização dessas moléculas. Entretanto, o método mais amplamente empregado é a utilização de CAS em meio de cultura (Schwyn & Neilands, 1987). O complexo ternário CAS, formado por cromo azurol S, ferro III e brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB), constitui-se em um corante de coloração azulada. Na presença de CAS adicionado a um meio de cultura adequado, bactérias que produzam fortes quelantes (sideróforos) são capazes de se multiplicar devido à remoção do ferro complexado ao corante. O processo de transferência é verificado através da mudança de coloração do meio, observada pela formação de um halo amarelado ao redor das colônias capazes de produzir sideróforos. A adição do complexo CAS ao meio de cultura é um método eficiente, uma vez que somente sob a produção de sideróforos, o íon férrico poderá ser utilizado pela bactéria (Neilands, 1993, 1995; LeVier & Guerinot, 1996).

Uma vez que os sideróforos não são produzidos por todos rizóbios, tal característica pode ser um critério de seleção para a subsistência de linhagens em solos com limitada disponibilidade de ferro (Carson *et al.*, 1992; Derylo & Skorupska, 1992). O ferro é indispensável na síntese de um grande número de componentes envolvidos diretamente na FBN, como por exemplo, as enzimas chaves dinitrogenase e dinitrogênio-reductase, e a molécula de leg-hemoglobina, essencial para o controle da tensão de oxigênio

dentro do nódulo. Os nódulos possuem uma concentração de ferro maior do que qualquer tecido da planta, e tanto o início quanto o desenvolvimento da nodulação dependem de um aumento na aquisição desse elemento. Conseqüentemente, mais ferro é requerido por plantas inoculadas com rizóbios, do que aquelas supridas com adubação nitrogenada (Derylo & Skorupska, 1992; Ragland & Theil, 1993; Yeoman *et al.*, 2000).

Embora os sideróforos tenham como papel principal a captação de ferro, é possível que eles desempenhem outras funções. É sabido que sideróforos aumentam a virulência de microrganismos patogênicos e também são capazes de quelar outros íons metálicos, como manganês, níquel, zinco e alumínio, porém, com menor afinidade quando comparados ao íon férrico (Neilands, 1993, 1995; Dilworth *et al.*, 1998; Roy & Chakrabarty, 2000). Além disso, a síntese de sideróforos pelos organismos do solo tem um efeito benéfico nas plantações, embora isso ainda não tenha sido totalmente esclarecido. Como benefício aos vegetais, a capacidade de captar complexos  $Fe^{3+}$ -sideróforo por determinados microrganismos pode impedir a proliferação de patógenos ao redor das raízes, devido ao seqüestro de ferro do ambiente rizosférico. Exemplos de PGPRs com esta atividade incluem *P. putida* e *P. aeruginosa*, que inibem o crescimento dos patógenos de tomate *Fusarium oxysporum* e *Pythium*, respectivamente (Vandendergh & Gonzalez, 1984; Buysens *et al.*, 1995).

Ao contrário dos fitopatógenos, as plantas não são prejudicadas com a depleção de ferro pelas PGPRs. Algumas plantas podem até mesmo capturar o complexo  $Fe^{3+}$ -sideróforo bacteriano, transportando-o e disponibilizando ferro para suas células (Crowley *et al.*, 1988). Derylo & Skorupska (1992) verificaram que plantas de trevo (*Trifolium* spp.) com nódulos efetivos, captam ferro mais eficientemente do que plantas não infectadas, supondo que o processo de infecção possa ser um sinal para o aumento da captação de ferro. Segundo Van Lonn & Bakker (2003), PGPRs podem reduzir populações de rizobactérias deletérias e de microrganismos fito-patogênicos por competição e produção de compostos antimicrobianos específicos, obtendo maior sucesso na nodulação. A questão que ainda permanece é a possibilidade de benefício obtido pela planta hospedeira na presença de rizóbios produtores de sideróforos durante a simbiose.

Bactérias geralmente regulam o metabolismo de ferro em resposta a disponibilidade desse elemento. Em *E. coli* e muitas outras bactérias Gram negativas, a regulação é mediada pela proteína Fur (*ferric uptake regulator protein*), que atua como

repressor positivo, reprimindo a transcrição de seus genes-alvo quando interage com  $\text{Fe}^{2+}$ , seu co-repressor. Na ausência de  $\text{Fe}^{2+}$  os genes são des-reprimidos (Andrews *et al.*, 2003). A homeostase de ferro é essencial para as células uma vez que em excesso, esse elemento pode ser deletério devido à associação com espécies reativas de oxigênio (através da reação de Fenton), gerando compostos capazes de danificar componentes celulares (Touati, 2000). Dessa forma, a regulação do ferro intracelular é fundamental para a manutenção das necessidades fisiológicas e, ao mesmo tempo, minimização de sua toxicidade.

Bactérias Gram negativas, como os rizóbios, são envolvidas por uma camada conhecida como membrana externa. Apesar da nomenclatura e semelhança com a bicamada lipídica das membranas citoplasmáticas, a membrana externa das Gram negativas possui apenas uma camada de fosfolípídeos e é recoberta por uma camada de lipo-polissacarídeos (Hogg, 2005). A membrana externa exibe pouca permeabilidade a solutos hidrofílicos e serve como uma barreira seletiva para diversos nutrientes, devido à presença de diferentes tipos de proteínas nela inseridas. As chamadas proteínas de membrana externa (OMPs – *outer membrane proteins*) são proteínas integrais responsáveis pela seleção e entrada de nutrientes para dentro da célula (Blanvillain *et al.*, 2007). Tais proteínas determinam a permeabilidade da membrana externa a compostos hidrofílicos e são agrupadas em três classes funcionais: a) porinas (canais não-específicos de difusão de compostos com peso molecular até 600 Da); b) canais específicos (proteínas similares às porinas, mas com capacidade de reconhecimento e transporte de substratos maiores, como por exemplo, a maltose) e c) canais de barreira ou receptores dependentes de TonB (proteínas que atuam no reconhecimento e internalização de complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforos específicos e vitamina B12, por transporte ativo) (Braun *et al.*, 1998; Nikaido, 2003; Blanvillain *et al.*, 2007).

Mesmo possuindo baixo peso molecular (menores que 1000 Da), os sideróforos ainda são muito grandes para serem transportados por porinas e canais específicos, o que também é dificultado devido à sua baixa concentração no meio externo e ao processo lento de transporte passivo pelos canais de difusão simples (Braun *et al.*, 1998; Wandersman & Delepelaire, 2004). Dessa forma, o reconhecimento e a ligação do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo a proteínas de membrana externa específicas é essencial para a captação e o transporte de ferro para dentro da célula (Neilands, 1981; De Weger *et al.*, 1986; Leong, 1986; Benite *et al.*, 2002). Embora a ligação de complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforos a proteínas de

membrana externa independa de outros fatores, o transporte através dos receptores requer energia. Tal processo ativo decorre de um gradiente de carga eletroquímica da membrana citosólica, que é dirigido por um complexo proteico transdutor de energia chamado de sistema TonB (Braun *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004; Boiero *et al.*, 2007). Todos os sistemas de captação de complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforos caracterizados até o momento, em bactérias Gram negativas, são dependentes de TonB (Carlton *et al.*, 2007).

A ação de TonB e a energia derivada da força próton motora é transferida aos receptores pela assistência de duas proteínas localizadas na membrana citoplasmática, ExbB e ExbD (Nikaido, 2003). O sistema TonB, já identificado em muitas Gram negativas e bastante conhecido em *E. coli* é, portanto, formado por três proteínas: TonB (proteína periplasmática ancorada à membrana interna pelo domínio hidrofóbico N-terminal) e ExbB e ExbD (proteínas integrais de membrana interna). O domínio C-terminal de TonB faz contato com o receptor para sideróforos da membrana externa, que, por sua vez, possui o chamado 'TonB box', um segmento de sete aminoácidos hidrofóbicos na região N-terminal; tal segmento, conservado entre os receptores dependentes de TonB, é essencial para a captação de  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo (Andrews *et al.* 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004).

Após ser reconhecido e transportado através da membrana externa por receptores específicos, o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo é carregado através do periplasma e membrana citosólica por proteínas ligantes periplasmáticas e transportadores associados à membrana citoplasmática, respectivamente. Cada proteína ligante aceita um complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo por vez, mas ainda não está claro se a proteína ligante capta o complexo diretamente do receptor de membrana externa, ou se o complexo é capturado após ser liberado no espaço periplasmático (Andrews *et al.*, 2003). O transportador periplasmático melhor caracterizado é a proteína FhuD de *E. coli*, que interage com diferentes tipos de sideróforos do tipo hidroxamato. O sistema de transporte através da membrana citosólica, conhecido como sistema do tipo ABC, pode ser encontrado tanto em bactérias Gram negativas quanto Gram positivas (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004; Boiero *et al.*, 2007). O sistema ABC para transporte de sideróforos do tipo hidroxamato em *E. coli* é composto de duas proteínas de membrana interna, FhuB (permease) e FhuC (ATPase), que transferem o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo para o citoplasma.

Microrganismos Gram positivos não necessitam de receptores de membrana externa, pois não a possuem, e nem do sistema TonB-ExbB-ExbD. O complexo ferro-sideróforo atravessa a membrana citosólica de bactérias Gram positivas através de uma proteína de ligação ancorada à membrana, e dos transportadores ABC (Andrews *et al.*, 2003).

Os receptores de membrana externa possuem alta especificidade para seus complexos Fe<sup>3+</sup>-sideróforos (Braun *et al.*, 1998). Embora *E.coli* K-12 possua seis receptores, ela conta com apenas três proteínas ligantes associadas ao sistema do tipo ABC: proteínas para o transporte de citrato férrico, hidroxamatos e catecóis. Outro exemplo é *P. aeruginosa*, que possui cerca de 35 receptores dependentes de TonB e apenas quatro transportadores periplasmáticos (Berman *et al.*, 2000). Tal fato está relacionado a maior especificidade dos receptores de membrana externa, do que as proteínas periplasmáticas ou as do sistema ABC, aos complexos Fe<sup>3+</sup>-sideróforo.

A estrutura cristalina de três receptores de sideróforos já é conhecida em *E. coli*: FepA (receptor de enterobactina), FecA (receptor de dicitrato férrico) e FhuA (receptor de ferricromo). Em *P. aeruginosa*, os receptores FpvA e FptA, relacionados à captação de pioverdina e pioquelina, respectivamente, também já tiveram suas estruturas definidas (Ferguson & Deisenhofer, 2002; Wandersman & Delepelaire, 2004; Krewulak & Vogel, 2007). Embora exista uma baixa similaridade de seqüência entre tais receptores (em torno de 20%), todos eles possuem estruturas proteicas bastante similares. O alinhamento de seqüências primárias de FepA, FecA e FhuA, assim como a superposição de suas estruturas tridimensionais, revela a existência de diversos resíduos conservados (Chimento *et al.*, 2003; Yue *et al.* 2003). Estes resíduos, tais como o segmento de sete aminoácidos hidrofóbicos na região N-terminal citado acima, provavelmente estão envolvidos na transmissão de mudanças conformacionais da parte externa para a interna do receptor (Wandersman & Delepelaire, 2004).

FhuA, o receptor mais estudado em *E. coli*, é especialmente interessante devido a sua capacidade de ligação e transporte de diversos substratos, como por exemplo, albomicina (sideróforo conjugado a um antibiótico), colicina M, diversos fagos e rifamicina (antibiótico), além do sideróforo ferricromo (Braun & Braun, 2002; Wandersman & Delepelaire, 2004). A estrutura de FhuA é similar a das porinas, mas FhuA de *E. coli* consiste de 714 aminoácidos e é uma proteína monomérica formada por um barril beta (ou folha beta) C-terminal de 78 kDa. Formada por 22 fitas antiparalelas, o

barril beta possui aproximadamente 70 Å de altura (Ferguson & Deisenhofer, 2002). As folhas-beta (em barris beta) estão tipicamente arranjadas de forma antiparalela e são comuns em porinas e outras proteínas de atravessam a membrana celular.

Em 1996, LeVier & Guerinot caracterizaram o primeiro receptor de membrana externa em rizóbios, descrito como FegA, ( $\text{Fe}^{3+}$ -siderophore-gathering) em *B. japonicum* 61A152. Em tal estudo, FegA apresentou os seguintes percentuais de identidade e similaridade, respectivamente, com proteínas receptoras de sideróforos do tipo hidroxamato: 33.2 e 55.2% para FoxA (receptor de  $\text{Fe}^{3+}$ -ferrioxamina em *Y. enterocolitica*) e 35.5 e 53.7% para FhuA (receptor de  $\text{Fe}^{3+}$ -ferricromo em *E. coli*). Em 2005, Benson e colaboradores localizaram *fegA* em um operon juntamente com o gene *fegB*, cujo produto é uma proteína de membrana interna. Análises de estirpes mutantes para esses genes revelaram que ambos são necessários para a utilização do sideróforo ferricromo, e um duplo mutante *fegAB*, mas não um mutante *fegB*, falha na estabilização da biossíntese normal da bactéria e não fixa nitrogênio. Como tal linhagem de bradirrizóbio não produz sideróforos do tipo ferricromo, a hipótese provável é que o operon *fegAB* seja necessário para internalizar o ferricromo-sideróforo quando este está disponível, além de possuir relação entre a sinalização planta/bactéria no processo de nodulação (Benson *et al.*, 2005).

Em *E. coli*, as proteínas relacionadas à captação de  $\text{Fe}^{3+}$ -ferricromo (tipo hidroxamato) são codificadas pelos genes localizados no operon *fhuACDB* (Braun *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004). Genes correspondentes aos genes *fhu* de *E. coli* foram identificados em *R. leguminosarum* por Stevens e colaboradores (1999), que caracterizaram o operon *fhuCDB* contendo um pseudogene *fhuA*, e por Yeoman e colaboradores (2000) com a identificação de uma cópia funcional de *fhuA*, que contém 2244 pb. Em ambos os estudos os mutantes *fhuCDB* e *fhuA* foram deficientes na captação de vicibactina, um sideróforo do tipo hidroxamato produzido por *R. leguminosarum*. FhuA de *R. leguminosarum* apresentou 29.9, 30.3 e 34% de identidade com FhuA de *E. coli*, FoxA de *Y. enterocolitica* e FegA de *B. japonicum* 61A152, respectivamente (Johnston, 2000; Yeoman *et al.*, 2000).

## **2 Objetivos**

O objetivo geral desse trabalho foi a identificação e a caracterização de genes relacionados à captação de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii*, visando um melhor entendimento quanto à função e os mecanismos de regulação de tal sistema nessa bactéria.

### **2.1 Objetivos específicos**

2.1.1 Analisar a produção de sideróforos por diferentes estirpes de *B. elkanii* e *B. japonicum*;

2.1.2 Identificar e caracterizar seqüências dos genes *fegA* e *fhuA* em *B. elkanii*;

2.1.3 Construir mutantes nulos de *B. elkanii* para o gene *fhuA*.

### 3 Material e métodos

#### 3.1 Meios de cultura, soluções e reagentes

A composição e o modo de preparo dos meios de cultura, soluções e reagentes citados nesta sessão estão descritos no Apêndice.

#### 3.2 Plasmídeos e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Todos os plasmídeos e *primers* utilizados nesse estudo encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1:** Vetores utilizados em experimentos de clonagem e plasmídeos recombinantes construídos nesse estudo.

Plasmídeos	Características relevantes	Referência
pGEM-T Easy	Ap <sup>R</sup> ; <i>lacZ</i> <sup>-</sup> ; T7p; SP6p; origem de replicação do fago F1	Promega®
pUC18	Ap <sup>R</sup> ; <i>lacZ</i> <sup>-</sup> ; Col-E1 replicon	Norlander <i>et al.</i> (1983)
pHGWFS7	Hyg <sup>R</sup> ; Sp <sup>R</sup> ; <i>gfp:gus</i> ; vetor binário	Invitrogen®
pHP45Ω	Pen <sup>R</sup> ; Sm <sup>R</sup> ; Sp <sup>R</sup> ; fragmento Ômega	Prentki & Kirsch (1984)
pK19 <i>mobsacB</i>	Km <sup>R</sup> Suc <sup>R</sup> ; <i>lacZ</i> <sup>-</sup> ; vetor mobilizável não-replicativo de <i>E. coli</i>	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pRK2013	Km <sup>R</sup> ; Mob <sup>1</sup> ; Tra <sup>1</sup> ; Col-E1 replicon; plasmídeo <i>helper</i>	Figurski & Helinski (1979)
<i>pfhuA587</i>	Ap <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 434 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587	Esse estudo
<i>pfhuA5079</i>	Ap <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 456 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	Esse estudo
<i>pfegA5079</i>	Ap <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 308 pb de <i>fegA</i> de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5079	Esse estudo
<i>pfhuA587gfp</i>	Ap <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 434 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 interrompido por cassete <i>gfp</i>	Esse estudo
<i>pfhuA587gfp/Sm/Sp</i>	Ap <sup>R</sup> ; Sm <sup>R</sup> ; Sp <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 434 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 interrompido por cassete <i>gfp/Sm/Sp</i>	Esse estudo
<i>pKfhuA587gfp</i>	Km <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 434 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 interrompido por cassete <i>gfp</i>	Esse estudo
<i>pKfhuA587gfp/Sm/Sp</i>	Km <sup>R</sup> ; Sm <sup>R</sup> ; Sp <sup>R</sup> ; contendo fragmento de 434 pb de <i>fhuA</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587 interrompido por cassete <i>gfp/Sm/Sp</i>	Esse estudo

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nesse estudo.

<i>Primer</i>	Seqüência 5'– 3'
<i>vegA</i> REV	G(C/T)TG(G/A)TT(A/G)TCIAG(A/G)TCIGC(C/T)TG
<i>vegA</i> FOR	GGCATCAACTTCCTGCCGTA(C/T)CAGGG
<i>fhuA</i> REV	TACTTCACGCCGAGTTCGTA
<i>fhuA</i> FOR_jap	GCACACGATGCTGTTCCGSSSTCGAC
<i>fhuA</i> FOR_elk	TGCTGTTCCGGCCTCGACTAC
<i>fhuA</i> REV_novo	CGGAACGAGGTGTTGCGGTA
<i>fhuA</i> FOR_novo	(G/C)(A/C)(T/C)CGA(G/T)CCCTACGG
<i>fhuA</i> REV_maior	TTGCCGGTGTGTAGCTCGAGGCCATGTCCGGAAACGAGGTGTTGCGGTA
M13 REV	CAGGAAACAGCTATGAC
M13 FOR	GTA AACGACGGCCAGT
<i>SiteFinder</i>	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTCGCACAGCGTCTCAAGCGGCCCGC NNNNNNGC GC
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC
SFP2	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC

\* N = G ou A ou T ou C (nucleotídeo desconhecido)

### 3.3 Linhagens bacterianas

As duas estirpes de *B. elkanii* utilizadas como inoculantes no plantio de soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019, foram os objetos de estudo deste trabalho, devido a sua importância comercial. Outras cinco estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 6100, SEMIA 6149, SEMIA 6157, SEMIA 6159 e SEMIA 6160), dez de *B. japonicum* (USDA1110, SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5085, SEMIA 6152, SEMIA 6155, SEMIA 6163 e SEMIA 6164) e uma de *Rhizobium leguminosarum* (SEMIA 2051) também foram utilizadas em distintos experimentos. As linhagens de rizóbios foram fornecidas pelo Centro de Fixação de Nitrogênio da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO/RS). A linhagem de *Escherichia coli* utilizada foi XL1-Blue. Todas as linhagens estão descritas na Tabela 3.

Para o cultivo padrão de bradirizóbios utilizou-se o meio levedura manitol (LM), com ou sem corante vermelho congo, e incubação a 28°C por sete dias (Somasegaram & Hoben, 1994). Para *E. coli* XL1-Blue, meio Luria Bertani (LB) e incubação a 37°C por 24 horas foram as condições utilizadas (Sambrook & Russel, 2001). Quando necessário, os meios de cultura sólidos ou líquidos foram suplementados com concentrações adequadas de antibióticos: para *Bradyrhizobium*, ampicilina (100 µg/mL), canamicina (40 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL), espectinomicina (100 µg/mL) e rifampicina (75 µg/mL) (Benson *et al.*, 2005); para *E. coli*, ampicilina (100 µg/mL), canamicina (30 µg/mL), estreptomicina (20 µg/mL), espectinomicina (75 µg/mL) (Sambrook & Russel, 2001).

**Tabela 3:** Linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo.

<b>Linhagens</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referência</b>
<b><i>E. coli</i></b>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> ( $\tau$ $\kappa^-$ $m\kappa^-$ ) <i>supE44 relA1 <math>\lambda^-</math> lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> )].	Coleção de laboratório
<b><i>B. elkanii</i></b>		
SEMIA 587 SEMIA 5019	fixadores de nitrogênio em simbiose com soja; estirpes de <i>B. elkanii</i> utilizadas como inoculante comercial no Brasil.	Fepagro/RS
SEMIA 6100 SEMIA 6149 SEMIA 6157 SEMIA 6159 SEMIA 6160	fixadores de nitrogênio em simbiose com soja, pertencente ao banco de culturas de microrganismos da FEPAGRO/RS.	Fepagro/RS
<b><i>B. japonicum</i></b>		
SEMIA 5079 SEMIA 5080	fixadores de nitrogênio em simbiose com soja; estirpes de <i>B. japonicum</i> utilizadas como inoculante comercial no Brasil	Fepagro/RS
USDA110	fixador de nitrogênio em simbiose com soja; utilizado como inoculante comercial nos EUA, Canadá e Argentina; genoma seqüenciado.	Fepagro/RS
SEMIA 566 SEMIA 586 SEMIA 5085 SEMIA 6152 SEMIA 6155 SEMIA 6163 SEMIA 6164	fixadores de nitrogênio em simbiose com soja, pertencente ao banco de culturas de microrganismos da FEPAGRO/RS.	Fepagro/RS
<b><i>R. leguminosarum</i></b>		
SEMIA 2051	fixador de nitrogênio em simbiose com diversas leguminosas, tais como lentilha, grão-de-bico e ervilha.	Fepagro/RS

### 3.4 Análise da produção de sideróforos em placa de Petri

A produção de sideróforos foi avaliada pelo tradicional método cromo azurol S (CAS) descrito por Schwyn & Neilands (1987). As análises em placas de Petri consistiram na adição de aproximadamente 5 mL de corante CAS à 25 mL de meio de cultura contendo pouco ou nenhum teor de ferro. Para tal, utilizou-se o meio King-B (King *et al.*, 1954) modificado: meio diluído cinco vezes e com manitol como fonte de carbono (ao invés de glicerol). O meio modificado foi chamado de King-B/Manitol (1:5).

Os testes foram realizados em triplicata com as 17 estirpes de bradirrízobios listadas acima e a linhagem de *R. leguminosarum* foi utilizada como controle positivo para

a produção de sideróforos (Carson *et al.*, 1992). As linhagens bacterianas foram inicialmente cultivadas em 3 mL de meio LM líquido a 28°C sob agitação constante de 128 rpm, por cinco dias para bradirrizóbios e por 2 dias para rizóbios. Dez µL das culturas foram inoculados em placas de Petri contendo meio King-B/Manitol (1:5) e corante CAS, as quais foram incubadas por dez dias em estufa a 28°C.

### **3.5 Extração de DNA genômico de bradirrizóbios**

O DNA genômico das culturas de bradirrizóbios foi extraído segundo procedimento descrito por Sá (2001) modificado. As células bacterianas foram multiplicadas em meio LM líquido e incubadas à 28°C durante sete dias sob agitação constante de 128 rpm. Alíquotas de 1,5 mL do caldo de cultura foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga esterilizados e com capacidade de 2 mL, por 5 minutos à 12.000 rpm; a precipitação das células foi realizada por três vezes consecutivas. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado resultante foi suspenso em 700 µL de TES (solução salina utilizada para a retirada de polissacarídeos e resíduos de meio de cultura aderidos às células) e, novamente, submetido à centrifugação por 3 minutos à 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500 µL de solução tampão TE1 e 25 µL de lisozima [20 mg/mL], com incubação a 37°C por 30 minutos (para enfraquecimento da parede celular). Após, 108 µL de SDS 20% e 5 µL de proteinase K foram adicionados e fortemente homogeneizados, incubando-se a 56°C por 15 minutos (para rompimento da membrana celular e degradação proteica, respectivamente). A seguir, adicionou-se 600 µL de acetato de amônio 8 M e as amostras foram mantidas por 30 minutos no gelo, sendo posteriormente centrifugadas por 20 minutos à 12.000 rpm, para precipitação dos substratos associados ao SDS 20%. O sobrenadante resultante (contendo DNA) foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril com capacidade de 1,5 mL. O DNA foi extraído pela adição de igual volume de fenol/clorofórmio, homogeneizando-se com cuidado até a formação de uma emulsão no tubo. Após centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm, a fase aquosa subsequente foi cuidadosamente transferida para um novo tubo com auxílio de micropipeta. O procedimento foi repetido utilizando-se, ao invés de fenol/clorofórmio, uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 24:1) (para limpeza do DNA e retirada dos resíduos de fenol). À fase aquosa, coletada e transferida para um novo tubo estéril, foram adicionados 100 mM de

NaCl e 0,6 volumes de isopropanol para a precipitação do DNA. Após 30 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70%, secado em estufa a 37°C e suspenso em 50 µL de solução TE2.

Para verificar-se a eficiência da extração de DNA genômico, 1 µL das amostras foi aplicado juntamente com 1 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 40%) em gel de agarose 0,8% (em tampão TBE 1X) contendo brometo de etídeo e submetido à eletroforese com corrente de 100 V. A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o fluorômetro Qubit™-Invitrogen®. As concentrações de DNA das soluções de trabalho foi de 50 ng/µL para PCR e de cerca de 5 µg/reação para Southern *blot*.

### **3.6 Amplificação em cadeia de fragmentos correspondentes aos genes *fegA* e *fhuA***

Os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587 e de *B. japonicum* SEMIA 5079 e USDA110 foram utilizados como molde nas reações de PCR. As reações foram elaboradas com *kit Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen®), em um volume total de 25 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL), 2,5 µL de PCR *Buffer* 10X, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5 µL de solução de dNTPs 1mM (1mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pMol. Tais amplificações (como todas as demais descritas nessa metodologia), foram realizadas em um termociclador do tipo PCR *Express Temperature Cycling System* (*Thermo Hybaid*).

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) utilizados para amplificação de um fragmento correspondente ao gene *fegA* foram obtidos na literatura referente à identificação desse gene na estirpe 61A152 de *B. japonicum* (LeVier & Guerinot, 1996). O tamanho do fragmento esperado, a partir da amplificação com os *primers fegA*-direto (*fegA* FOR) e *fegA*-reverso (*fegA* REV), é de aproximadamente 300 pb. Para amplificação, utilizou-se o protocolo descrito por LeVier & Guerinot (1996): um passo inicial de desnaturação à 94°C por 1 minuto e 30 segundos seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos e, por fim, 8 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos. Uma vez que o protocolo descrito acima mostrou-se ineficiente para amplificação do fragmento a partir do DNA da estirpe SEMIA 587 de *B. elkanii* diferentes tentativas de amplificação foram realizadas. Entre

essas se destaca a utilização de PCR com gradiente de temperatura, com posteriores ciclos de PCR *touchdown*, conforme o seguinte programa: um passo inicial de desnaturação à 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, variação (por reação) de 58 à 72°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (PCR gradiente); a seguir 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (PCR *touchdown*); por fim, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos e 4°C por 10 minutos.

Para amplificação de um outro gene relacionado à captação de sideróforos em rizóbios, realizou-se a análise dos possíveis genes codificadores de receptores de sideróforos no genoma da estirpe modelo de *B. japonicum* USDA110. O gene predito *tonB-dependent receptor-blr4504* (acesso BA000040.2 – GenBank NCBI) apresenta 49% de identidade com o gene *fhuA* (acesso AJ315451), identificado em *Rhizobium leguminosarum* (Stevens *et al.*, 1999); a identidade de aminoácidos, entretanto, é de 34%. Após análise em banco de dados (GenBank NCBI) de seqüências do gene *fhuA* e suas regiões conservadas de diferentes microrganismos (alinhamentos não mostrados), optou-se pelo alinhamento simples entre o respectivo gene de *R. leguminosarum* com *blr4504* de USDA110 para projeção dos *primers fhuA*. Para tal utilizou-se os programas Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Duas regiões conservadas foram escolhidas para a construção de *primers* específicos para amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb, chamado de *fhuA* (Figura 1). Nas amplificações com as estirpes de *B. japonicum* foi utilizado o conjunto de *primers fhuA*-reverso (*fhuA* REV) e *fhuA*-direto específico para *B. japonicum* (*fhuA* FOR\_jap), e com as estirpes de *B. elkanii* o conjunto *fhuA* REV e *fhuA*-direto específico para *B. elkanii* (*fhuA* FOR\_elk). O protocolo de amplificação utilizado foi o seguinte: um passo inicial de desnaturação à 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos e, por fim, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Para checagem dos produtos de amplificação obtidos com as diferentes reações de PCR, 5 µL de cada reação foram aplicados juntamente com 2 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 40%) em gel de agarose 1 % (em tampão TBE 1x) contendo brometo de etídeo e submetido à eletroforese com corrente de 80 V.

```

                1317      1325                1341  1344
fhuA_R.leguminosarum GTCCCCCTTGCGGCACACGATGCTGTTCGGGCCTCGACTACACCAATCTCCAGTCGAACTGGGGC
tonB_USDA110          GCATCCTCAGCCACACCACGCTGGTCCGGGATCGACTATCGCAACACCTCCTT---CCGCGAC
*   ***   ***** *   ***** *   ***** *   ***** *   *   *   *   *   *
fhuA_R.leguminosarum TACGGCATCGGCGCGTCAACTCGGCCTTCGATTTCGATATCGCCAACCCGACCTATGGTGT
tonB_USDA110          ACCGCCTTTGGCGTCACGACCTCGGCCCCCGAGATCAACGTGTTCAATCCGGTCTATAGC--
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fhuA_R.leguminosarum CTCGGGCGCCACGCGGC-CTATGACTTCATCGTTGCCGATGCCGATATGCGCCAAGTCGGC
tonB_USDA110          TACGATTGGACCATCGGCGCGATGA--GCGACAACACCCGGCGTCAAGCAGTCGCAGGTCCGGC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fhuA_R.leguminosarum TTTACGCCCTTGACCAGATCGAGGCTGGA-AACTGGCGTTTCAACCTCGGCGGTGCCAGAC
tonB_USDA110          TCTACGCGCAGGACCAGATCAGGCTCGGCGCGGTGTCGTTCCAGC-TCGGCGGTGCCAGGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fhuA_R.leguminosarum CTGGGTGAACCAGACGCGTGACACGACCTATCCCTCCTTCGGGTTGAACGACTCGGAAGACG
tonB_USDA110          TTTTCGTCACC---ACGCAGGTCGACAGCGGTATCTTCGACACATCG---GTCTCGAAGGATG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fhuA_R.leguminosarum TCAACAAGAACGCCTTCTCTGGCAAGCCGGCGCGCTTTACCTCTTCGACAACGGCATTGCA
tonB_USDA110          CTTTCG-----GCCTTCACTGGCCGCGCCGCGGTGATGTACAATTTCAACAACGGCATCGCG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
fhuA_R.leguminosarum CCCTTCGTCTCCTATGCGACCTCGTTCGACCCGGTCACC--AACCGGTCGGCATCCGGCAAG
tonB_USDA110          CCGTATTTTCAGCTATTCGAGTCGTTTCTGCCGGTGCTCGCAACCCGGACCCGGG---CGGCCAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                1744                1766
fhuA_R.leguminosarum ATCTGGAGCCGACCGAGGGTGAACAGTACGAACTCGGGCGTGAAGTACCAGCCGCCGGGCAC
tonB_USDA110          CTGCTCAACCCTGAAACCCGGCGTGAGTACGAGGTCGGCGTAAAGTACCAGCCGATCGGATG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 1:** Parte do alinhamento entre os genes *fhuA* de *R. leguminosarum* (*fhuA\_R.leguminosarum*) e *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 (*tonB\_USDA110*), referente à região escolhida para projeção dos primers *fhuA*. Os números acima das seqüências referem-se à seqüência do gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110. As regiões conservadas da seqüência do gene *fhuA* de *R. leguminosarum*, destacadas em negrito e sublinhadas, foram utilizadas para construção dos primers *fhuA* FOR\_jap (posição 1317 à 1341), *fhuA* FOR\_elk (posição 1325 à 1344) e *fhuA* REV (posição 1744 à 1766). Asteriscos indicam nucleotídeos conservados entre as seqüências comparadas. Alinhamento: Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

### 3.7 Clonagem de fragmentos dos genes *fegA* e *fhuA* obtidos por PCR, extração de plasmídeos e seqüenciamento

Os fragmentos de interesse obtidos por PCR com os primers correspondentes aos genes *fegA* e *fhuA*, utilizando-se DNA genômico de SEMIA 587 de *B. elkanii* e SEMIA 5079 de *B. japonicum*, foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®) (conforme instruções do fabricante). O vetor utilizado é portador do gene de resistência ao antibiótico ampicilina e do gene *lacZ*. As reações de ligação do fragmento ao vetor foram utilizadas para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-Blue termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina, ampicilina, X-Gal 4% e IPTG 0,1 M. Dez

colônias brancas obtidas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio LB líquido, tetraciclina e ampicilina para extração de plasmídeos.

Plasmídeos foram extraídos de acordo com Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. Alíquotas de 1,5 mL do caldo de cultura foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga (do tipo *ependorf*), esterilizados, com capacidade de 2 mL, por 5 minutos à 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado resultante foi suspenso em 200 µL da Solução I. Cinco µL de RNase (Invitrogen®) foram adicionados e as amostras incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200 µL da Solução II e após forte homogeneização os tubos foram mantidos por 5 minutos no gelo. A seguir foram adicionados 200 µL da Solução III e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos à 12.000 rpm. O sobrenadante foi vertido em novos tubos *ependorfs* estéreis com capacidade de 1,5 mL, sendo novamente centrifugados por 10 minutos à 12.000 rpm. Por fim, ao sobrenadante coletado para novo tubo estéril foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol para precipitação do DNA. Após 20 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70%, secado em estufa a 37°C e suspenso em 50 µL de solução TE2.

Para verificar-se a eficiência da extração de plasmídeos, 1 µL das amostras foi aplicado juntamente com 1 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 40%) em gel de agarose 0,8% (em tampão TBE 1x) contendo brometo de etídeo e submetido à eletroforese com corrente de 100 V, utilizando-se como controle negativo plasmídeos extraídos de colônias azuis, onde nenhum fragmento foi inserido ao vetor.

Para confirmação da clonagem dos fragmentos de interesse, os plasmídeos que apresentaram maior peso molecular em relação ao controle negativo foram quantificados no fluorômetro Qubit<sup>TM</sup>-Invitrogen® e submetidos à clivagem com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Promega®), que cliva o plasmídeo na região de ligação do inserto. Para a clivagem de 1 µg de plasmídeo a 37°C por 3 horas foi utilizada 1 U de enzima e volume adequado de tampão 10 X concentrado, além de água ultra pura estéril para completar o volume. Além das clivagens, também foi realizada a amplificação por PCR dos sítios posicionados entre as regiões de inserção dos fragmentos, utilizando-se os *primers* M13/pUC (M13 FOR e M13 REV). As reações de amplificação foram elaboradas conforme descrito no primeiro parágrafo do subitem 3.6, utilizando-se o *kit Taq DNA*

*Polymerase Recombinant* (Invitrogen®). O protocolo de amplificação conteve os seguintes passos: um ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e, por fim, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Entre os clones positivos, amostras com tamanho esperado de cada um dos fragmentos de interesse, *fegA* e *fhuA*, foram escolhidas para cada uma das estirpes analisadas (*B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079). Os plasmídeos recombinantes escolhidos foram novamente extraídos, utilizando-se o *kit* S.N.A.P.<sup>TM</sup> *MiniPrep* (Invitrogen®) e quantificados (Qubit<sup>TM</sup>-Invitrogen®). Cerca de 200 ng de plasmídeo foram utilizadas para as reações de seqüenciamento contendo 1 µL de *primer* M13 FOR 5 pMol. As amostras foram preparadas em tubos do tipo *ependorf* (capacidade de 0,6 mL) em um volume total de 6 µl e, seqüenciadas no seqüenciador automático *Applied Biosystem* modelo *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer*, do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

No total, foram enviadas para seqüenciamento duas construções contendo os fragmentos amplificados com os *primers fhuA* (uma de *B. elkanii* SEMIA 587 [*pfhuA587*] e uma de *B. japonicum* SEMIA 5079 [*pfhuA5079*]) e seis plasmídeos contendo fragmentos de amplificação obtidos com os *primers fegA* (cinco de *B. elkanii* SEMIA 587 [*pfegA587.2*, *pfegA587.4*, *pfegA587.5*, *pfegA587.6* e *pfegA587.7*] e um de *B. japonicum* SEMIA 5079 [*pfegA5079*]). As seqüências obtidas foram analisadas por BLASTn/NCBI *on line* e pelos programas FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.), Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0 (Hall, 1999). As seqüências de aminoácidos derivadas da tradução dos fragmentos de interesse foram analisadas por BLASTp/NCBI *on line*.

### **3.8 Híbridização por Southern blot**

As seqüências dos genes *blr4504* de *B. japonicum* USDA110, *fegA* de *B. japonicum* 61A152 e *bll4920* de *B. japonicum* USDA110, assim como dos fragmentos de interesse obtidas por seqüenciamento, foram analisadas quanto à presença de sítios de clivagem para diferentes enzimas de restrição. As enzimas *ApaI*, *HindIII* e *KpnI* (Promega®), foram escolhidas devido à ausência de sítio de restrição entre todas as seqüências analisadas. Para a clivagem de cerca de 10 µg de DNA genômico das estirpes SEMIA 587 de *B. elkanii* e SEMIA 5079 e USDA110 de *B. japonicum*, foram utilizadas 30

U de enzima e volume adequado de tampão 10 X concentrado específico, em reações incubadas por no mínimo 16 horas a 37°C.

O volume de cada clivagem foi igualmente dividido e cada alíquota (contendo aproximadamente 5 µg de DNA genômico clivado) foi aplicada em duplicata em gel de agarose 0,8% (em tampão TBE 1x) contendo brometo de etídeo. A ordem das amostras no gel foi repetida, com exceção dos controles positivos de hibridização: fragmento de 308 pb de *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 e fragmento de 434 pb de *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, aplicados no início de cada conjunto de amostras respectivamente.

O gel foi submetido à eletroforese com corrente de 50 V, por aproximadamente 6 horas. Após esse período, o gel foi fotografado com régua sobre luz UV e, a seguir, submetido às seguintes etapas: 1) desnaturação e neutralização dos fragmentos de DNA em gel de agarose; 2) transferência (por um período de 16 h) dos fragmentos para uma membrana de náilon (GE Healthcare®); 3) fixação do DNA à membrana por 2 horas a 80°C. A partir desse momento, a membrana de náilon foi cortada e cada membrana, contendo exatamente a mesma seqüência de amostras de DNA foi hibridizada com as sondas específicas (*fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 para a membrana 1 e *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 para a membrana 2). Todos os procedimentos foram conduzidos conforme descrito no manual do *kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems* (Amersham Biosciences®).

Os fragmentos utilizados como sondas e controles positivos de hibridização, foram obtidos por clivagem com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Promega®), de aproximadamente 10 µg dos seguintes plasmídeos recombinantes (confirmados por seqüenciamento): *pfegA5079* e *pfhuA587*. Os fragmentos de 308 pb de *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 e de 434 pb de *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 foram purificados do gel de agarose (*kit* GFX, GE Healthcare®) e quantificados (Qubit<sup>TM</sup>-Invitrogen®) para devidas utilizações.

### **3.9 Isolamento de regiões adjacentes ao fragmento amplificado do gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587**

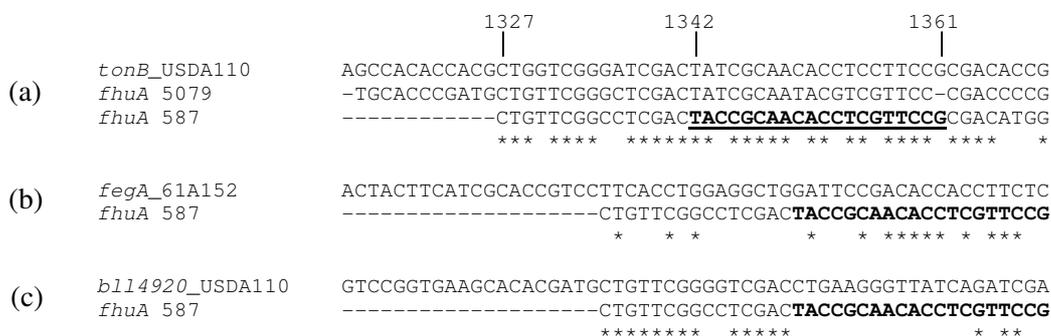
Visando a obtenção de um fragmento correspondente ao gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 de maior tamanho e também da região reguladora desse gene foram empregadas, em diferentes ocasiões, as distintas estratégias descritas abaixo.

### 3.9.1 Primeira estratégia: Construção de novos *primers fhuA*

Com base na seqüência correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 de 434 pb, foi projetado um outro *primer* reverso: *fhuA* REV\_novo. Para tal, fez-se o alinhamento das seqüências dos fragmentos correspondentes aos genes *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e *fhuA* de *B. japonicum* SEMIA 5079, com a seqüência do gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110, para análise de identidade entre os nucleotídeos correspondentes.

Uma vez que *fegA* e *fhuA* são genes com alto índice de identidade, as seqüências correspondentes aos genes *fegA* de *B. japonicum* 61A152 e seu correspondente em *B. japonicum* USDA110, o gene *bll4920*, foram alinhadas com a seqüência do fragmento do gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 para análise da dissimilaridade de nucleotídeos entre elas.

A porção inicial do fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, ou seja, a extremidade 5' sequenciada, foi escolhida para projeção do novo *primer* reverso. A região mais adequada para tal, isto é, que fosse conservada entre as duas seqüências dos fragmentos *fhuA* e *blr4504* e que, ao mesmo tempo, apresentasse dissimilaridade de nucleotídeos com *fegA*, está representada na figura abaixo (Figura 2).



**Figura 2:** Parte dos alinhamentos analisados para projeção do novo *primer* reverso *fhuA* REV\_novo. Em (a), alinhamento da extremidade 5' sequenciada do fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 (*fhuA* 587) com a região correspondente de *fhuA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 (*fhuA* 5079) e de *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 (*tonB\_USDA110*), para análise da identidade nucleotídica. Análises de dissimilaridade também foram feitas pela comparação com *fegA* de *B. japonicum* 61A152 (b) e *bll4920* de *B. japonicum* USDA110 (c). A região destacada em negrito e sublinhada, na seqüência *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, foi utilizada para construção do novo *primer*. Asteriscos indicam nucleotídeos conservados entre as seqüências comparadas. Os números acima das seqüências referem-se à seqüência de *blr4504* de *B. japonicum* USDA 110. Alinhamento: Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

Para a projeção de um novo *primer fhuA* direto, comparou-se a seqüência de *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 com as seqüências de outros genes que codificam



A combinação específica de tais *primers*, segundo a análise da seqüência de *blr4504*, resulta na amplificação de um fragmento de aproximadamente 750 pb. As reações de amplificação foram elaboradas conforme descrito no primeiro parágrafo do subitem 3.6, utilizando-se o *kit Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen®). As condições utilizadas foram inicialmente testadas através de uma PCR gradiente, conforme segue: um passo inicial de desnaturação à 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, variação (por amostras) de 55,1 a 70,3°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos; por fim, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos, 4°C por 10 minutos. Após checagem dos produtos de amplificação em gel de agarose 1%, submetido à eletroforese com corrente de 100 V, verificou-se que a melhor temperatura de anelamento foi a de 57,6°C.

Novos ciclos de PCR à temperatura de 57,6°C foram realizados com diferentes concentrações de DNA genômico (10, 50 e 70 ng/μL) e a banda de interesse foi purificada do gel de agarose (*kit* Invitrogen®) e ligada no vetor pGEM-T Easy (Promega®) (conforme instruções do fabricante). As reações de ligação foram usadas para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-Blue termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). Após seleção dos transformantes e extração de plasmídeos (conforme descrito no subitem 3.7), a confirmação das clonagens positivas foi feita através de clivagens com a enzima *EcoRI* (Promega®). Entre os plasmídeos que liberaram bandas de tamanho esperado, três foram escolhidos para seqüenciamento (com 1 μL de *primer* M13 FOR 5 pMol): pNovofhuA587.1, pNovofhuA587.2 pNovofhuA587.3 O seqüenciador utilizado foi o mesmo descrito no subitem 3.7.

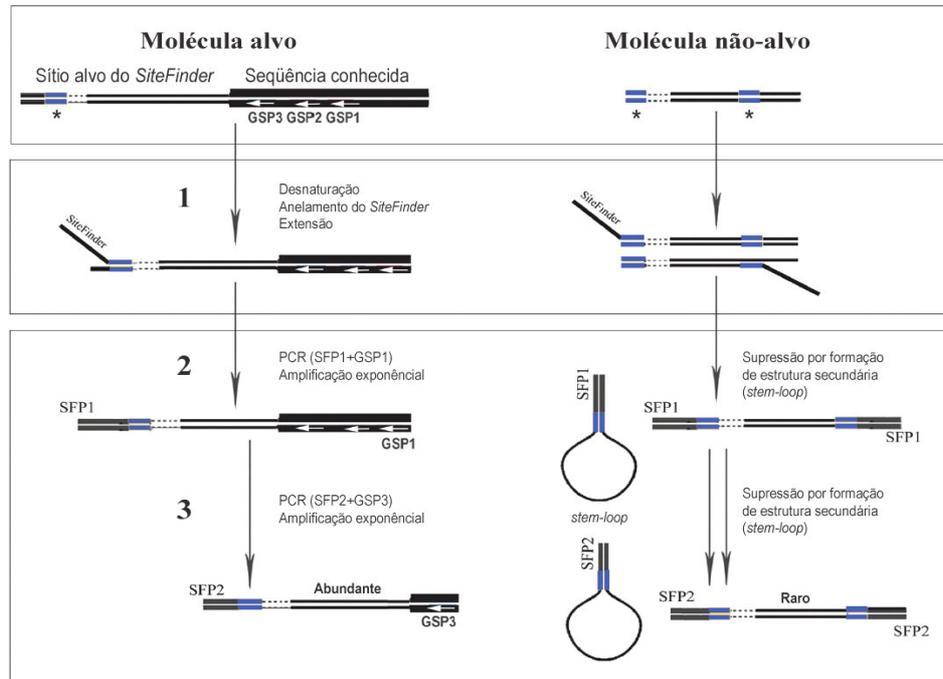
As seqüências obtidas foram analisadas por BLASTn/NCBI *on line* e pelos programas FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.), Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0 (Hall, 1999).

### **3.9.2 Segunda estratégia: SiteFinding-PCR**

Uma adaptação do método descrito por Tan e colaboradores (2005) foi realizada, conforme exemplificado na Figura 4.

Para realização desta técnica foi projetado um novo *primer* reverso específico, com base na seqüência correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587: *primer fhuA* REV\_maior (Figura 5). Esse *primer* foi usado, segundo o esquema abaixo, como GSP1, enquanto que o outro *primer* reverso projetado e descrito no subitem 3.9.1

(*fhuA* REV\_novo) foi usado como GSP2. Os demais *primers* utilizados na técnica de *SiteFinding*-PCR estão descritos na Tabela 2.



**Figura 4:** Adaptação da técnica de *SiteFinding*-PCR, que pode ser resumida em três etapas principais: Reação de *SiteFinding* (1), reação primária do *Nested* PCR (2) e reação secundária do *Nested* PCR (3). Asteriscos indicam os sítios de reconhecimento para os oligonucleotídeos *SiteFinder*. *Primers* gene específicos (GSP1, GSP2 e GSP3) anelam-se nas seqüências conhecidas e *primers Site Finding* (SFP1 e SFP2) anelam-se nos oligonucleotídeos *SiteFinders* já ligados aos sítios-alvo. A reação de *SiteFinding* PCR consiste dos seguintes passos: após anelamento dos oligonucleotídeos *SiteFinders* em baixa temperatura, uma fita é sintetizada pela *Taq* DNA polimerase, gerando moléculas alvo em dupla fita de diferentes tamanhos (1); na reação primária do *Nested* PCR (2), o DNA alvo é amplificado exponencialmente com SFP1 e GSP1, enquanto que a amplificação de moléculas não alvo é suprimida pela formação de um *stem-loop* na estrutura do DNA; na reação secundária do *Nested* PCR (3), novamente o DNA alvo é amplificado exponencialmente por um *primer* alvo específico mais interno (GSP2 ou GSP3) combinado com o *primer* SFP2, enquanto que a amplificação de moléculas não alvo é suprimida por formação de estrutura secundária. No produto final, a representação das moléculas alvo é bastante superior a de moléculas não alvo.

```
> fhuA 587_fragmento 434 pb
CTGTTTCGGCCTCGACTACCGCAACACCTCGTTCCGCGACATGGCCTCGAGCTACAGCACCGGCAAAGCTCAACG
TCTTCGCGCCGGTCTATACCAACAGCTGGATCAACAACGGACCGTATGACGACACCGGCATCAAGCAGTCGCA
GGCCGGCCTCTATCTGCAGGACCAGATCAGGCTCGGACGGCTGTCTCGTTCCCTGCTCGGCGGGCGGCAGGATTTT
GTCACCACCGACCTCGACAACAATCTCGCGAAGACGTCGACCTCGACCGATGCTTCGGCATTACCGGCCGCG
CCGCCGTATGTACAATTTTCGACAATGGCATCGCGCCCTATTTTCAGCTATTCGGAATCATTCCTGCCGGTGTCT
GAGCATCAACGCCCGCCGGCGAACTGCTGAAGCCGGAGTCCGGCGTCCAGTACGAACCTCGGCGTGAAGTA
```

**Figura 5:** Fragmento de 434 pb de *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 [referente à construção *pfhuA587* (subitem 3.7)]. A região destacada em negrito e sublinhada foi utilizada para construção do novo *primer fhuA* REV\_maior.

Para a reação de *SiteFinding* (incorporação de oligonucleotídeos *SiteFinders* no genoma bacteriano), cada mistura de PCR continha 4 µL de 5 X *Green GoTaq Buffer* (Promega®), 5 µL de solução de dNTPs 1 mM, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega®), 0,25 µL de *GoTaq Hot Start Polymerase* (5U/µL) (Promega®), 1 µL de *SiteFinder* 10 pMol e 20, 50 ou 100 ng de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 (em diferentes reações). O volume foi completado para 20 µL com água ultra pura estéril e um único ciclo de PCR foi feito, de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4:** Condições das reações de amplificação utilizadas para PCR *SiteFinding*.

Reação	Ciclo(s)	Condições
<i>SiteFinding</i>	1	92°C (2 min), 95°C (1 min), 25°C (1 min), 68°C por 10 min
<i>Nested</i> PCR primário	1	94°C (1min)
	30	95°C (10 seg), 65°C (30 seg), 68°C (6 min)
	1	72°C (5 min)
<i>Nested</i> PCR secundário	1	94°C (1min)
	30	95°C (10 seg), 62°C (30 seg), 68°C (6 min)
	1	72°C (5 min)

Para a reação primária de *Nested* PCR, foram adicionados aos tubos contendo 20 µL da reação de *SiteFinding* (mantidos no gelo): 1 µL de 5 X *Green GoTaq Buffer* (Promega®), 1 µL de *primer* SFP1 50 pMol, 1 µL de *primer fhuA* REV\_maior 10 pMol e 2 µL de água ultra pura estéril. Trinta ciclos de PCR foram feitos de acordo com a Tabela 4.

Um µL da reação primária de *Nested* PCR foi diluído 50 X em água ultra pura estéril (1:50). Um µL desta diluição foi utilizado para a reação secundária de *Nested* PCR, que também continha: 10 µL de 5 X *Green GoTaq Buffer* (Promega®), 2,5 µL de solução de dNTPs 1 mM, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega®), 0,25 µL de *GoTaq Hot Start Polymerase* (5U/µL) (Promega®), 0,5 µL de *primer* SFP2 10 pMol, 2,5 µL de *primer fhuA* REV\_novo 10 pMol e água ultra pura estéril para completar o volume final de 50 µL. Novamente, 30 ciclos de PCR foram realizados, conforme descrito na Tabela 4.

Os produtos finais de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% submetido à eletroforese com corrente de 80 V. Utilizando-se a reação primária de *Nested* PCR diluída 50 X como molde da reação secundária de *Nested* PCR, obteve-se a amplificação de bandas de peso molecular em torno de 1000 pb. Essas bandas foram purificadas de gel de agarose (*kit* GFX (GE Healthcare) e ligadas no vetor pGEM-T Easy

(Promega®) (conforme instruções do fabricante). As reações de ligação foram usadas para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-Blue termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). Após seleção dos transformantes e extração de plasmídeos, a confirmação das clonagens foi feita através de reações de PCR com os *primers* M13 REV e M13 FOR (conforme subitem 3.7). Entre os plasmídeos que liberaram bandas de tamanho esperado, foram escolhidos para seqüenciamento, com 1 µL de *primer* M13 FOR 5 pMol: pSF*fhuA*587.1 e pSF*fhuA*587.2. O sequenciador utilizado foi o mesmo descrito no subitem 3.7.

As seqüências obtidas foram analisadas por BLASTn/NCBI *on line* e pelos programas FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.), Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0 (Hall, 1999).

### **3.9.3 Terceira estratégia: Construção de uma biblioteca genômica parcial de *B. elkanii***

Primeiramente, experimentos de Southern *blot* genômico foram realizados com diferentes enzimas de restrição, a fim de que fosse identificado um fragmento de DNA que contivesse o gene *fhuA* completo (fragmento maior que 2,5 Kb) e que, ao mesmo tempo, não possuísse tamanho molecular maior que 5,0 Kb, para facilitar a construção da biblioteca. A enzima *EcoRI* foi escolhida, pois a banda resultante da hibridização (com a sonda *fhuA*) do DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 clivado com essa enzima, apresentou aproximadamente 4,0 Kb.

Para a construção da biblioteca parcial, cerca de 10 µg de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 foram clivados em uma reação contendo tampão 10 X adequado e 30 U da enzima *EcoRI* (Promega®), além de água ultra pura estéril para completar o volume de 200 µL; a reação foi incubada a 37°C por 16 horas. Dois µL da digestão foram aplicados em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 100V, para confirmação da clivagem. O DNA clivado foi concentrado em 30 µL utilizando-se centrífuga à vácuo. O volume de 30 µL de DNA foi aplicado em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese com corrente de 50 V por 6 horas. Logo após, os fragmentos de peso molecular de aproximadamente 4 Kb (correspondentes à banda de hibridização de interesse) foram purificados do gel de agarose (*kit* Invitrogen), suspensos em 70 µL de água ultra pura estéril e o DNA foi quantificado (Qubit<sup>TM</sup>-Invitrogen®).

Paralelamente, cerca de 2,5 µg do vetor pUC18 também foram clivadas com a enzima *EcoRI* (Promega®) sob condições adequadas por 4 horas. Dois µL da digestão foram aplicados em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese com corrente de 100 V. Após confirmação da clivagem, a reação foi mantida a 65°C por 15 minutos para inativação enzimática. Posteriormente, o plasmídeo clivado foi defosforilado com a adição de 0,5 U da enzima SAP (utilizando-se para essa reação o mesmo tampão de *EcoRI*); a reação foi incubada por 2 horas a 37°C. O *background* de plasmídeos não clivados foi conferido através de transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-*Blue* termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina e ampicilina.

A reação do plasmídeo pUC18 defosforilado foi purificada em coluna com o *kit* Invitrogen® e o DNA foi quantificado (Qubit™-Invitrogen®). Para ligação dos fragmentos de aproximadamente 4 Kb ao vetor, foram preparadas três reações de ligação contendo cinco vezes mais fragmentos do que vetor (proporção 5:1), utilizando-se T4 DNA Ligase e tampão 10 X (Promega®), além de água ultra pura estéril para completar o volume de 20 µL; as reações foram incubadas a 4°C por 16 horas. Dez µL de cada ligação foi utilizado para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-*Blue* termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina, ampicilina, X-Gal 4% e IPTG 0,1 M.

As colônias brancas obtidas foram organizadas (utilizando-se palitos de madeira estéreis) em placas de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina e ampicilina. Para cada placa foi realizada hibridização de colônias, utilizando-se como sonda o fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, conforme procedimentos descritos no manual do *kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems* (Amersham Biosciences®). Os plasmídeos das bactérias que apresentaram sinal forte na hibridização de colônias foram extraídos conforme descrito no subitem 3.7 (Sambrook & Russel, 2001) e checados em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 100 V.

Após quantificação (Qubit™-Invitrogen®), cerca de 2 µg de cada DNA plasmidial foram clivadas com a enzima *EcoRI* (Promega®) para liberação do fragmento de interesse clonado ao vetor pUC18. Reações de PCR com os *primers fhuA* (*fhuA* REV e *fhuA* FOR\_elk) também foram realizadas (conforme subitem 3.7). Os plasmídeos que apresentaram melhores resultados nos experimentos de clivagem e PCR, foram novamente

clivados com *EcoRI*; todo volume das reações de clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese com corrente de 80 V por 3 horas. Após esse período, os géis foram fotografados com régua sobre luz UV e os fragmentos transferidos para uma membrana de náilon (GE Healthcare®), para posterior hibridização com a sonda *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587.

### **3.10 Construção de mutantes nulos de *B. elkanii* SEMIA 587 para o gene *fhuA*, utilizando-se cassete *gfp* e cassete *gfp/Sm/Sp***

Para a construção de mutantes nulos para o gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, foi utilizada a estratégia de mutagênese via inserção de cassete gênico. Para tal, duas abordagens foram realizadas: 1) interrupção do fragmento *fhuA* de 434 pb pelo cassete contendo o gene *gfp* (*green fluorescent protein*) sem a região promotora e 2) interrupção do fragmento *fhuA* de 434 pb pelo cassete *gfp/Sm/Sp* [gene *gfp* sem a região promotora e cassete, com promotor próprio, contendo os genes de resistência aos antibióticos estreptomicina (Sm) e espectinomicina (Sp)].

O cassete *gfp* utilizado nesse estudo foi obtido do vetor pHGWS7 (Invitrogen®), disponível em nosso laboratório. O cassete *Sm/Sp* (com interposon Ômega) encontra-se clonado no vetor pHP45Ω (Prentki & Kirsch, 1984) e foi cedido pelo Dr. William Broughton, da Universidade de Genebra (Suíça). Os fragmentos de interesse interrompidos pelo cassete *gfp* e pelo cassete *Sm/Sp*, foram isolados e clonados em vetor conjugativo. Para transferência das construções, foram utilizadas duas maneiras: 1) conjugação triparental entre *B. elkanii* SEMIA 587, *E. coli* XL1-Blue carregando a construção de interesse e *E. coli* XL1-Blue carregando o plasmídeo *helper* e 2) transformação por choque térmico de *B. elkanii* SEMIA 587 termo-competentes com a construção de interesse. O plasmídeo conjugativo utilizado foi pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) e o plasmídeo *helper*, pRK2013 (Figurski & Helinski (1979).

#### **3.10.1 Clivagem de *pfhuA587* com a enzima de restrição *NruI***

Inicialmente, o plasmídeo *pfhuA587* foi clivado com a enzima *NruI* (Promega®), que apresenta um sítio único de restrição no fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, situado a 247 nucleotídeos do início desse fragmento (considerando-se a fita codificadora) (Figura 6). Dois µL da reação foram aplicados em gel de agarose 0,8%

submetido à eletroforese com corrente de 100 V para confirmação da clivagem. Após inativação enzimática por 15 minutos a 65°C, todo volume da reação foi purificado por coluna (*kit* Invitrogen®).

```
> fhuA 587_fragmento 434 pb
CTGTTCGGCCTCGACTACCGCAACACCTCGTTCCGCGACATGGCCTCGAGCTACAGCACCGGCAAGCTCAACG
TCTTCGCGCCGGTCTATACCAACAGCTGGATCAACAACGGACCGTATGACGACACCGGCATCAAGCAGTCGCA
GGCCGGCCTCTATCTGCAGGACCAGATCAGGCTCGGACGGCTGTCGTTCCTGCTCGGGCGGGCGGCAGGATTTC
GTCACCACCGACCTCGACAACAATCTCGCGAAGACGTCGACCTCGACCGATGCTTCGGCATTCACGGCCGCG
CCGGCGTCATGTACAATTTCGACAATGGCATCGCGCCCTATTTCAGCTATCGGAATCATTCTGCGCGGTGCT
GAGCATCAACGCCGCCGGCGAACTGCTGAAGCCGGAGTCCGGCGTCCAGTACGAACTCGGCGTGAAGTA
```

**Figura 6:** Fragmento de 434 pb de *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 [referente à construção *pfhuA587* (subitem 3.7)]. Os nucleotídeos destacados em negrito referem-se aos códons em fase de leitura correta (na primeira fase) para a tradução de *fhuA*: observa-se que após clivagem com a enzima *NruI* (sítio de restrição TCG'CGA sublinhado), um nucleotídeo (G) permanece sobressalente ao último códon (CTC) da primeira metade do fragmento clivado. A clivagem com *NruI* cliva o fragmento de 434 pb de *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 na posição 247; a metade que resta do fragmento possui 187 pb.

### 3.10.2 Obtenção dos cassetes *gfp* e *Sm/Sp*

Para obtenção do cassete *gfp*, a seqüência do gene *gfp* contida no vetor pHGWFS7 foi cuidadosamente analisada para que o fragmento isolado contivesse o número correto de nucleotídeos para entrar em fase de leitura com o fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 (após ligação do cassete *gfp* ao vetor *pfhuA587\_NruI*, no próximo subitem 3.10.3). Para tal, era necessário que a seqüência isolada de *gfp* contivesse dois nucleotídeos antes do seu códon inicial de leitura (primeiro ATG).

Dessa forma, o vetor pHGWFS7 foi inicialmente clivado com as enzimas *SacII* e *NruI* (Promega®) a 37°C por 4 horas. Após inativação das enzimas de restrição a 65°C por 15 minutos, foram adicionados à reação 3 µL de DNA Polimerase I/fragmento de Klenow (com atividade de exonuclease 3'-5') (Invitrogen®) e tampão 10 X adequado; a reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Finalmente, todo o produto de clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V, e a banda de 800 pb referente ao gene *gfp*, foi purificada do gel (*kit* Invitrogen®). Parte da seqüência oriunda do vetor pHGWFS7, contendo o gene *gfp*, está ilustrada abaixo: os sítios de restrição referentes às enzimas *SacII* e *NruI*, estão destacados em negrito (Figura 7).

> *gfp\_vetor* pHGWFS7

```

          SacII
          |
GTGATATCCCGCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG
TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGC
TGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCATATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTT
CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGC
GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA
AGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GCCCCGCATGTTACGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTAGT
CTGGATTCGCGAAAACTGTGGAA
          |
          NruI

```

**Figura 7:** Parte da seqüência nucleotídica do plasmídeo pHGWFS7, contendo o gene *gfp*. Após clivagem de pHGWFS7 com as enzimas *SacII* (sítio de restrição CCGC'GG destacado em negrito) e *NruI* (sítio de restrição TCG'CGA destacado em negrito), é liberado, entre outros fragmentos, um de aproximadamente 800 pb referente ao gene *gfp*. Para que tal fragmento contivesse os dois nucleotídeos necessários antes de seu primeiro ATG (ATG sublinhado), o produto de clivagem foi submetido à atividade exonucleásica da DNA polimerase I/fragmento de Klenow e, posteriormente, purificado do gel de agarose.

Para obtenção do cassete *Sm/Sp*, o vetor pHP45Ω foi clivado com a enzima *SmaI* (Promega®) a 25°C por 4 horas. Após inativação da enzima de restrição a 65°C por 15 minutos, todo o produto de clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V, e a banda de 2 Kb, referente ao cassete *Sm/Sp*, foi purificada do gel (kit Invitrogen®).

### 3.10.3 Construção de *pfhuA587gfp* e *pfhuA587gfp/Sm/Sp*

Uma reação de ligação do cassete *gfp* ao vetor *pfhuA587* clivado com *NruI*, foi feita utilizando-se a proporção 5:1 de cassete:vetor, T4 DNA Ligase e tampão 10X (Promega®), além de água ultra pura estéril para completar o volume de 10 µL; a reação foi incubada a 4°C por 16 horas. A ligação foi utilizada para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-*Blue* termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina e ampicilina.

Dezoito colônias brancas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio LB líquido, tetraciclina e ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos de acordo com Sambrook & Russel (2001) (conforme descrito no subitem 3.7) e checados em gel de

agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 100 V, utilizando-se como comparativo a construção *pfhuA587*. Os plasmídeos que apresentaram maior peso molecular do que *pfhuA587*, foram clivados com a enzima *EcoRI* (Promega®) a 37°C por 4 horas, para confirmação da clonagem. Os produtos de clivagem foram aplicados em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V. O plasmídeo chamado *pfhuA587gfp*, que liberou uma banda de 3 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) e uma de aproximadamente 1,2 Kb (correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 interrompido pelo cassete *gfp*), foi enviado para seqüenciamento com os *primers* M13 FOR e M13 REV (conforme descrito no subitem 3.7).

Após confirmação por seqüenciamento da orientação correta de entrada do cassete, a construção *pfhuA587gfp* foi clivada com *NruI* (Promega®), que cliva entre o final do gene *gfp* e a metade final (187 pb) do fragmento *fhuA*.

Uma reação de ligação do cassete *Sm/Sp* ao vetor *pfhuA587gfp* clivado com *NruI*, foi feita utilizando-se a proporção 5:1 de cassete:vetor, T4 DNA Ligase e tampão 10X (Promega®), além de água ultra pura estéril para completar o volume de 10 µL; a reação foi incubada a 4°C por 16 horas. A ligação foi utilizada para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-Blue termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina e espectinomicina.

Três colônias brancas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio LB líquido, tetraciclina e espectinomicina. O DNA plasmidial de apenas uma das três culturas foi extraído com *kit* S.N.A.P.<sup>TM</sup> *MiniPrep* (Invitrogen®) e clivado com *EcoRI* (Promega®) a 37°C por 4 horas, para confirmação da clonagem. O produto da clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V. O plasmídeo chamado *pfhuA587gfp/Sm/Sp*, que liberou uma banda de 3 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) e uma de aproximadamente 3,2 Kb (correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 interrompido pelo cassete *gfp/Sm/Sp*), foi enviado para seqüenciamento com os *primers* M13 FOR e M13 REV (conforme descrito no subitem 3.7).

Após confirmação da clonagem, os plasmídeos *pfhuA587gfp* e *pfhuA587gfp/Sm/Sp* foram clivados com *EcoRI* (Promega®) a 37°C por 4 horas, para liberação dos insertos. Os produtos da clivagem foram aplicados em gel de agarose 0,8%,

submetido à eletroforese com corrente de 80 V e os fragmentos *fhuA587gfp* (de aproximadamente 1200 pb) e *fhuA587gfp/Sm/Sp* (de aproximadamente 3200 pb), contendo extremidades coesivas derivadas do sítio de restrição de *EcoRI*, foram purificados do gel (*kit* Invitrogen®).

#### **3.10.4 Sub-clonagem dos fragmentos *fhuA587gfp* e *fhuA587gfp/Sm/Sp* no vetor conjugativo pK19*mobSacB***

O vetor conjugativo pK19*mobSacB* foi cedido pelo Dr. Volker Wendisch da Universidade de Munique (Alemanha). pK19*mobSacB*, derivado do plasmídeo pK19 de *E. coli*, é um vetor não-replicativo que carrega um gene de resistência à canamicina (derivado de Tn5) e o gene *sacB* modificado (derivado de *B. subtilis*).

O plasmídeo pK19*mobSacB* foi clivado com *EcoRI* (Promega®), que possui um único sítio de restrição no sítio de policlonagem. A linearização de pK19*mobSacB*, origina uma banda de aproximadamente 5,7 Kb. O produto de clivagem foi aplicado em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 100 V, para confirmação da clivagem. O plasmídeo linearizado pK19*mobSacB* e os fragmentos *fhuA587gfp* e *fhuA587gfp/Sm/Sp*, foram quantificados utilizando-se o fluorômetro Qubit™-Invitrogen®.

Posteriormente, os fragmentos *fhuA587gfp* e *fhuA587gfp/Sm/Sp* foram subclonados no sítio de *EcoRI* de pK19*mobSacB*, utilizando-se a proporção 5:1 de fragmento:vetor, T4 DNA Ligase e tampão 10X (Promega®), além de água ultra pura estéril para completar o volume de 10 µL; as reações foram incubadas a 4°C por 16 horas. A ligação foi utilizada para transformação por choque térmico de *E. coli* XL1-*Blue* termo-competentes (Sambrook & Russel, 2001). A seleção foi feita em placa de Petri contendo meio LB sólido, tetraciclina e canamicina para seleção dos transformantes contendo o fragmento *fhuA587gfp*. Para seleção dos transformantes contendo o fragmento *fhuA587gfp/Sm/Sp* utilizou-se LB sólido, tetraciclina, canamicina e espectinomicina.

Uma colônia branca de cada uma das transformações foi inoculada em tubos de ensaio contendo meio LB líquido e antibióticos adequados. Os plasmídeos foram extraídos com *kit* S.N.A.P.™ *MiniPrep* (Invitrogen®) e clivados com enzimas de restrição para confirmação das clonagens. O plasmídeo chamado pK*fhuA587gfp* foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Promega®) e o plasmídeo chamado pK*fhuA587gfp/Sm/Sp* foi clivado com *BamHI*, *HindIII*, *PstI* e *SalI* (Promega®), a 37°C por 4 horas. Os produtos das

clivagens foram aplicados em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V. Após confirmação das bandas de tamanho esperado, pKfhuA587gfp e pKfhuA587gfp/Sm/Sp foram enviados para sequenciamento com os primers M13 FOR e M13 REV (conforme descrito no subitem 3.7).

Paralelamente, o plasmídeo *helper* pRK2013 (cedido pelo prof. Emanuel de Souza, da UFPr), que é utilizado em experimentos de conjugação triparental, foi introduzido em *E. coli* XL1-Blue termo-competentes, por transformação por choque térmico (Sambrook & Russel, 2001). Uma colônia foi inoculada em tubo de ensaio contendo meio LB líquido, tetraciclina e canamicina. Plasmídeos foram extraídos com o kit S.N.A.P.<sup>TM</sup> MiniPrep (Invitrogen®) e checados em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese com corrente de 80 V, para confirmação da transformação.

### **3.10.5 Transformação por choque térmico de *B. elkanii* SEMIA 587 utilizando-se as construções pKfhuA587gfp e pKfhuA587gfp/Sm/Sp**

Nesse experimento, as construções pKfhuA587gfp e pKfhuA587gfp/Sm/Sp foram separadamente utilizadas para transformação de *B. elkanii* SEMIA 587 por choque térmico. O protocolo de transformação foi adaptado de Vincze & Bowra (2006).

Inicialmente, a linhagem SEMIA 587 de *B. elkanii* foi inoculada em 3 mL de meio LM e mantida a 28°C sob agitação constante de 128 rpm por 5 dias. Após, 1,5 mL do caldo de cultura foi precipitado em centrífuga à 12.000 rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias diluído em 3 mL de LM. Esse novo inóculo foi incubado a 28°C sob agitação constante de 128 rpm pelo tempo de 13 horas, até atingir a fase estacionária. Novamente, 2 mL dessa cultura foram inoculados em 20 mL de meio LM e incubados sob agitação constante de 128 rpm pelo tempo de 24 horas.

Alíquotas de 1,5 mL da cultura foram pipetadas em seis tubos *ependorfs* estéreis com capacidade de 2 mL e centrifugadas a 12.000 rpm e 4°C por 10 minutos. Os seis tubos foram retirados da centrífuga diretamente para o gelo. Os sobrenadantes foram descartados e todos os precipitados suspensos com 2 mL de CaCl<sub>2</sub> gelado e estéril. O volume de 2 mL de células suspensas em CaCl<sub>2</sub> foi alíquotado em um tubo *falcon* estéril com capacidade de 14 mL e mantido por 30 minutos no gelo. Após esse período, alíquotas de 100 µL foram pipetadas em tubos *ependorfs* com capacidade de 0,6 mL, que posteriormente foram suspensos em nitrogênio líquido por 5 segundos e retirados

diretamente para o gelo. Imediatamente após, a cada tubo contendo 100 µL de células competentes de *B. elkanii* SEMIA 587, 6 µL de cada um dos plasmídeos pKfhuA587gfp e pKfhuA587gfp/Sm/Sp foram adicionados para transformação por choque térmico à 40°C por 5 minutos.

Após o choque térmico, as células foram mantidas por 2 minutos no gelo e, posteriormente, 500 µL de meio LM líquido foram adicionados ao volume de células, utilizando-se tubos *ependorfs* com capacidade de 1,5 mL, mantidos a 28°C por 3 horas. A seguir, as células transformadas foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LM e antibióticos adequados: canamicina para transformação com pKfhuA587gfp e canamicina, espectinomicina e estreptomicina para transformação com pKfhuA587gfp/Sm/Sp. Como controle, células competentes não transformadas foram inoculadas em meio LM com e sem os antibióticos descritos acima. Nessa etapa, as colônias de *B. elkanii* SEMIA 587 multiplicadas em placa de Petri com antibiótico foram chamadas de primeira geração.

### **3.10.6 Conjugação triparental utilizando-se as construções pKfhuA587gfp e pKfhuA587gfp/Sm/Sp**

Dois experimentos de conjugação triparental foram conduzidos com as seguintes bactérias: 1) *B. elkanii* SEMIA 587, *E. coli* XL1-Blue contendo pKfhuA587gfp e *E. coli* XL1-Blue contendo pRK2013 e 2) *B. elkanii* SEMIA 587, *E. coli* XL1-Blue contendo pKfhuA587gfp/Sm/Sp e *E. coli* XL1-Blue contendo pRK2013.

Inicialmente, cada linhagem foi inoculada em meio de cultura líquido, conforme as condições necessárias. A conjugação foi feita em placa de Petri contendo meio LM sem antibióticos, inoculando-se com alça de platina, no canto esquerdo da placa as bactérias isoladas (para conferência da multiplicação) e, no restante, as três linhagens misturadas na seguinte ordem de inoculação: *E. coli* XL1-Blue contendo pRK2013, *E. coli* XL1-Blue contendo pKfhuA587gfp ou pKfhuA587gfp/Sm/Sp e *B. elkanii* SEMIA 587. A placa foi incubada em estufa a 28°C por 4 dias.

Nos tempos de 48, 72 e 96 horas pós-conjugação, diversas alíquotas das células bacterianas conjugadas foram re-inoculadas, com alça de platina, em placas de Petri contendo meio LM com antibiótico adequado, para seleção dos transconjugantes: na conjugação com pKfhuA587gfp utilizou-se canamicina e na conjugação com pKfhuA587gfp/Sm/Sp, foi utilizado estreptomicina e espectinomicina. Além desses

antibióticos, todas as placas continham ampicilina para selecionar somente células de *B. elkanii* SEMIA 587 (e não de *E. coli*). Nessa etapa, as colônias de *B. elkanii* SEMIA 587 multiplicadas em placa de Petri com antibiótico foram chamadas de primeira geração.

### 3.11 Metodologia em andamento

#### 3.11.1 Seleção e análise de colônias de *B. elkanii* SEMIA 587 contendo a construção pK*fhuA587gfp*

A seleção de linhagens *B. elkanii* SEMIA 587 advindas da transformação por choque térmico ou do experimento de conjugação, para os quais utilizou-se a construção pK*fhuA587gfp*, está sendo realizada conforme descrito abaixo.

Após multiplicação das bactérias da primeira geração em meio contendo canamicina, todas as colônias serão inoculadas (com palitos de madeira estéreis) em duplicata, tanto em placas contendo LM, ampicilina e canamicina, como em placas contendo somente LM e ampicilina, por mais três gerações. Tal procedimento visa a obtenção de colônias de *B. elkanii* SEMIA 587 que se multipliquem apenas em meio com LM e ampicilina, nas quais a recombinação dupla entre o gene *fhuA* e o fragmento *fhuA587gfp* já tenha possivelmente ocorrido e, o plasmídeo pK19*mobsacB* tenha sido eliminado.

Após a quinta geração de isolamentos, as colônias que se multiplicarem em meio LM com ampicilina e não em meio LM com ampicilina e canamicina, serão utilizadas em reações de PCR com os *primers fhuA* FOR\_ elk e *fhuA* REV, conforme descrito no terceiro parágrafo do subitem 3.6. No caso de transconjugantes positivos, a amplificação com os *primers fhuA* resultará em um fragmento de aproximadamente 1200 pb (referente ao fragmento *fhuA587gfp*) e ausência de amplificação do fragmento correspondente à *fhuA* de aproximadamente 400 pb. O DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 selvagem será utilizado como controle nas reações de PCR.

As bactérias isoladas, que apresentarem o resultado esperado nas reações de PCR, terão seu DNA genômico extraído e analisado conforme descrito no subitem 3.5. O DNA das bactérias será submetido à clivagem com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* e experimentos de Southern *blot* serão conduzidos conforme descrito no subitem 3.8,

utilizando-se como sonda o fragmento de 434 pb *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 (*kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems* (Amersham Biosciences®)).

### **3.11.2 Seleção e análise de colônias de *B. elkanii* SEMIA 587 contendo a construção pK*fhuA587gfp/Sm/Sp***

A seleção de linhagens *B. elkanii* SEMIA 587 advindas da transformação por choque térmico ou do experimento de conjugação, para os quais se utilizou a construção pK*fhuA587gfp/Sm/Sp*, está sendo realizada conforme descrito abaixo.

Todas as colônias de primeira geração serão sucessivamente re-inoculadas (com palitos de madeira estéreis) em placas contendo LM, ampicilina e espectinomicina, até a sétima geração. As colônias persistentes serão utilizadas em reações de PCR com os *primers fhuA* FOR\_ elk e *fhuA* REV, conforme descrito no subitem anterior (3.11.1). No caso de colônias positivas, a amplificação com os *primers fhuA* resultará em um fragmento de aproximadamente 3200 pb (referente ao fragmento *fhuA587gfp/Sm/Sp*) e/ou ausência de amplificação do fragmento correspondente à *fhuA* de aproximadamente 400 pb. O DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 selvagem será utilizado como controle nas reações de PCR.

As bactérias isoladas, que apresentarem o resultado esperado nas reações de PCR, terão seu DNA genômico extraído e analisado conforme descrito no subitem 3.5. O DNA das bactérias será submetido à clivagem com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* e experimentos de Southern *blot* serão conduzidos conforme descrito no subitem 3.8, utilizando-se como sonda o fragmento de 434 pb de *fhuA* 587 (*kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems* (Amersham Biosciences®)).

### **3.11.3 Isolamento e identificação do tipo de sideróforo produzido pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *B. elkanii***

Os procedimentos necessários para a identificação do tipo de sideróforo produzido pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *B. elkanii*, estão sendo conduzidos em parceria com a Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Diferentes placas de Petri contendo meio King-B/Manitol (1:5) e corante CAS, incubadas por dez dias em estufa a 28°C, foram inoculadas com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. Um bloco de 1 cm<sup>2</sup>

foi cortado da região do halo e, um bloco de ágar correspondente, no qual não houve multiplicação bacteriana, foi usado como controle.

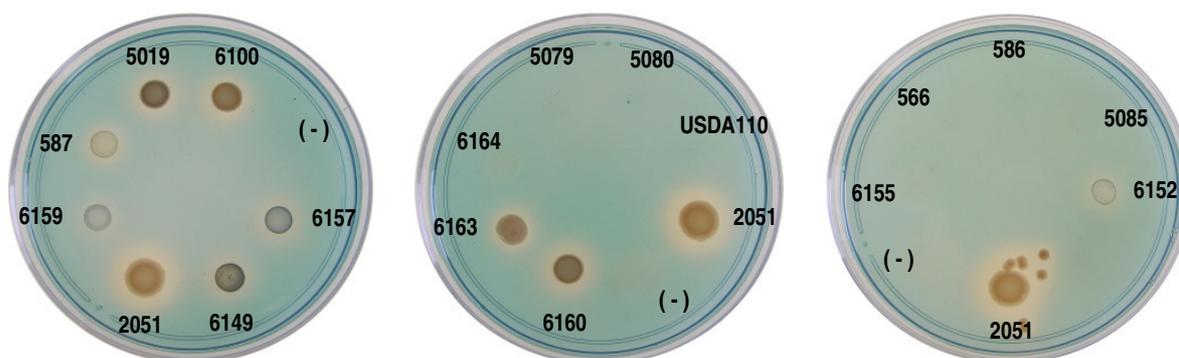
As amostras serão extraídas por eluição com 2 mL de NaOH 0,1 M por 1 minuto sob agitação. Após centrifugação, o sobrenadante será filtrado (com membrana de 0,22 µm) e injetado em um sistema de eletroforese capilar. Um capilar fusionado à sílica, com 75 µm de diâmetro interno e 37 cm de comprimento total, será utilizado. As amostras serão injetadas por 5 segundos sob 0,5 psi com voltagem de 30 kV e temperatura constante de 25°C. A separação das amostras será monitorada à 214 nm usando um detector UV. O capilar será condicionado, após cada corrida, pela seguinte seqüência de reagentes: HCl 1 M (1 min), NaOH 1 M (1 min), água deionizada (1 min), NaOH 0,1 M (1 min) e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 5 (2 min). Os picos obtidos no eletroferograma serão analisados pelo programa P/ACE System (Beckman) (Silva-Stenico *et al.*, 2005).

Os sideróforos serão analisados pelos métodos de Arnow, para identificação de sideróforos do tipo catecol (Arnow, 1937), e de Csáky para o tipo hidroxamato (Csáky, 1948), utilizando-se ácido 2,3-dihidroxibenzóico e hidrocloreto de hidroxilamina como padrões, respectivamente.

## 4 Resultados

### 4.1 Análise da produção de sideróforos em placa de Petri

A produção de sideróforos foi verificada pelo cultivo dos isolados em placas de Petri contendo meio de cultura deficiente em ferro [King-B/Manitol (1:5)] e o complexo CAS (Schwyn & Neilands, 1987). Diferentes estirpes de *B. elkanii* e *B. japonicum*, utilizando-se *R. leguminosarum* como controle positivo, foram avaliadas. Os testes foram realizados em duplicata e a produção de sideróforos foi considerada positiva para aquelas estirpes que apresentaram a formação de halo ao redor da colônia. Todas as sete estirpes de *B. elkanii* avaliadas apresentaram-se como produtoras de sideróforos, exibindo a formação de colônias envoltas por halos alaranjados. Ao contrário, dentre dez linhagens de *B. japonicum*, apenas duas tiveram produção positiva (Figura 8).



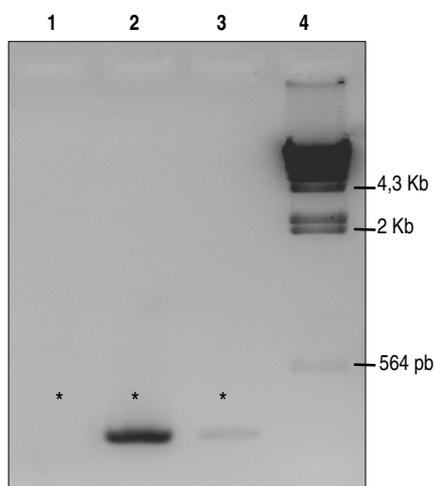
**Figura 8:** Análise da produção de sideróforos em placas de Petri contendo meio sólido deficiente em ferro (King-B/Manitol 1:5) e corante CAS. *R. leguminosarum* SEMIA 2051 foi utilizada como controle positivo para a produção de sideróforos. Como controle negativo utilizou-se 10 µL de meio King-B/Manitol (1:5) [indicado por (-)]. *B. elkanii* SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 6100, SEMIA 6149, SEMIA 6157, SEMIA 6159, SEMIA 6160 apresentaram a formação de colônias envoltas por halos, sendo consideradas produtoras de sideróforos. Entre as dez estirpes de *B. japonicum* analisadas, apenas SEMIA 6152 e SEMIA 6163 são produtoras, ao passo que SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 5085, SEMIA 6155, SEMIA 6164 e USDA110 não foram capazes de se multiplicar em meio deficiente em ferro porque não produzem sideróforos.

### 4.2 Isolamento, clonagem e seqüenciamento de fragmentos dos genes *fegA* e *fhuA*

Com o intuito de se isolar pelo menos um gene funcional que codifique proteínas de membrana receptoras de sideróforos em *B. elkanii*, dois genes já identificados em rizóbios foram analisados: *fegA* (*B. japonicum* 61A152) e *fhuA* (*R. leguminosarum*).

Para determinação dos oligonucleotídeos iniciadores, as seqüências de interesse de genes correlacionados (identificados ou preditos) de *B. japonicum* foram tomadas como referência devido à proximidade filogenética.

Utilizando-se os *primers* *fegA* e o protocolo de amplificação descrito por LeVier & Guerinot (1996), o tamanho de fragmento esperado na amplificação é de aproximadamente 300 pb. Quando os DNAs genômicos de *B. japonicum* SEMIA 5079 e USDA110 foram utilizados como molde, a amplificação resultou em uma banda de tamanho esperado, mas com *B. elkanii* SEMIA 587, nenhum produto de amplificação foi obtido (Figura 9).



**Figura 9:** Gel de agarose 1% mostrando os resultados da PCR com os *primers* *fegA* FOR e *fegA* REV, utilizando-se os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587 (1), de *B. japonicum* SEMIA 5079 (2) e de *B. japonicum* USDA110 (3). Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III (4). Os asteriscos indicam a ausência da banda de interesse na amplificação com o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 e a presença da mesma para *B. japonicum* SEMIA 5079 e USDA110.

O produto de PCR obtido pela amplificação com os *primers* *fegA* em *B. japonicum* SEMIA 5079 foi diretamente clonado no vetor pGEM-T Easy, utilizado para transformação de *E. coli* XL1-Blue. Doze colônias brancas foram analisadas por PCR com os *primers* M13/pUC reverso e direto, que se anelam às posições 176-197 e 2949-2972 do vetor pGEM-T Easy, respectivamente. Entre os plasmídeos que amplificaram corretamente a banda de interesse, o denominado *pfegA5079*, foi enviado para seqüenciamento. A seqüência de 308 pb obtida foi analisada em banco de dados (BLASTn/NCBI) e alinhada com as seqüências dos genes *fegA* de *B. japonicum* 61A152 e seu correspondente em *B. japonicum* USDA110, *bll4920* (Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0) (Figura 10). O gene *fegA* e o gene *bll4920* apresentam 83% de identidade. O fragmento de 308 pb correspondente à *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079, apresentou 96% de identidade com *fegA* e 84% com *bll4920*.

```

          904
          |
fegA 5079   -GGCATCAACTTCCTGCCGTATCAGGGCACGGTGACGAACGCGCCGTTCCGGCAAGATCCCGACCAGCTTCTTCGC
fegA 61A152 CGGCATCAACTTCCTGCCTTACCAGGGCACGGTGACGAACGCGCCGTTCCGGCAAGATCCCGACCAGCTTCTTCGC
bll4920 USDA110 CGGCATCAACTTCCTGCCGTATGTCGGGACGGTCACCAATGCCTCGTTCGGCAAGATCCCGACCAGCTTCTTTGC
          ***** **          ** ***** ** ** ** ***** ***** ***** ***** **

fegA 5079   CGGCGATCCCAGCGTCGATAAGTTACGCGCGAGCAGGAGATGCTCGGCTATCAGTTCGAGCGCAATCTCACCGA
fegA 61A152 CGGCGATCCCAGCGTCGATAAGTTACGCGCGAGCAGGAGATGCTCGGCTATCAGTTCGAAACGCAATCTCACCGA
bll4920 USDA110 CGGCGATCCCAGCGTCGACAAGTTACGCGCGAGCAGGAGATGCTCGGCTACCAGTTCGAGCGCAATCTCACCGA
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

fegA 5079   CGATCTGACGTTCCGTCAGAATGCGCGATTGCGCATATCGACCTGACCTATCGCGGTTACATCGGCAACGGCTG
fegA 61A152 CGATCTAACTTTCCGGCAGAATGCGCGATTGCGCATATCGACCTGACCTATCGCGGCTATATCGGCAACGGCTG
bll4920 USDA110 CGATCTGACATTCCGGCAGAATGCGCGTTTGCCCATGTGACGTGACCTATCGTGGCTATGTCGGCAACGACTA
          ***** * * ***** ***** ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * *

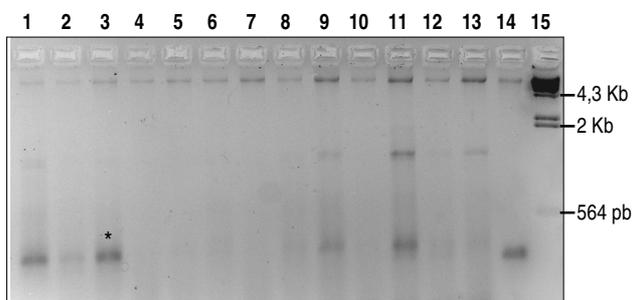
fegA 5079   GGACAATATCAATGCGGCCCTCTCTGGTTCGCTACAATTGGTATGCTAAGGACACCGCCAACCAGGCAGATCTTGA
fegA 61A152 GGACAATATCAATGCGGCCCTCTCTGGTTCGCTACAATTGGTATGCTAAGGACACCGCCAACCAGGCAGATCTTGA
bll4920 USDA110 CGGCAATCAGGCAACCGCCACGCTCAACCGCTACAATTGGTATGCGAAGAACACCGCCAACCAGGCAGATCTCGA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          1211
          |
fegA 5079   TAACCAACA-
fegA 61A152 CAACCAGCTG
bll4920 USDA110 CAACCAGCTC
          ***** *

```

**Figura 10:** Alinhamento entre o fragmento de 308 pb de *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 (*fegA* 5079), com as regiões correspondentes aos genes *fegA* de *B. japonicum* 61A152 (*fegA* 61A152) e *bll4920* de *B. japonicum* USDA110 (*bll4920* USDA110). Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos. Os números acima das seqüências referem-se à seqüência do gene *fegA* de *B. japonicum* 61A152. Alinhamento: Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

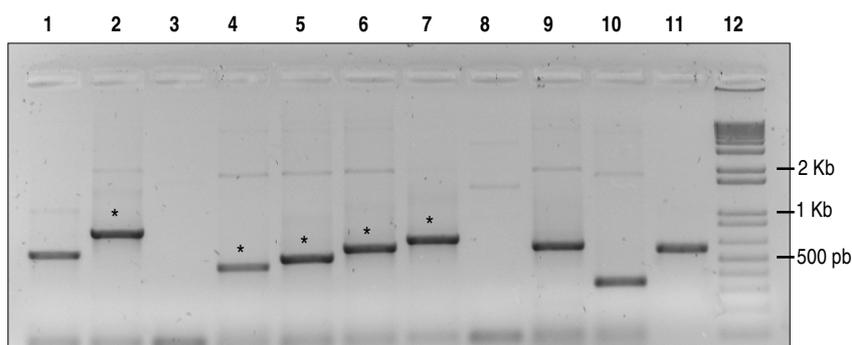
Na tentativa de amplificar o fragmento de interesse correspondente ao gene *fegA* em *B. elkanii* SEMIA 587, diversas variações nas condições de PCR foram realizadas. Com a realização de uma PCR gradiente com posteriores ciclos de PCR *touchdown*, obteve-se a amplificação da banda de tamanho esperado à temperatura de 63°C (Figura 11, canaleta 3).



**Figura 11:** Gel de agarose 1% apresentando o resultado da PCR gradiente com os *primers fegA* FOR e *fegA* REV, utilizando-se o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 (1 à 13) em diferentes temperaturas de anelamento. Na canaleta de número 3, onde a temperatura de anelamento da PCR foi 63°C, obteve-se a amplificação de uma banda de tamanho esperado (marcada com um asterisco). O DNA de *B. japonicum* SEMIA 5079 (14) foi utilizado como controle positivo. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *HindIII* (15).

O produto da reação de número 3 foi diretamente clonado no vetor pGEM-T Easy, utilizado para transformação de *E. coli* XL1-Blue. Dez colônias brancas foram

analisadas por PCR com os *primers* M13/pUC reverso e direto. Os plasmídeos de número 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram bandas de tamanho aproximado ao esperado (Figura 12) e foram enviados para seqüenciamento. Tais plasmídeos foram denominados *pfegA587.2*, *pfegA587.4*, *pfegA587.5*, *pfegA587.6* e *pfegA587.7*. As seqüências obtidas foram analisadas em banco de dados (BLASTn/NCBI), entretanto, nenhuma delas apresentou homologia com o gene *fegA*. Os resultados observados em banco de dados estão descritos na Tabela 5.

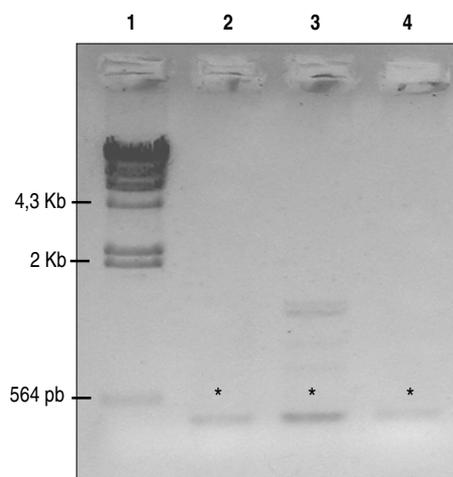


**Figura 12:** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da PCR com os *primers* M13/pUC reverso e direto, utilizando-se os DNAs plasmidiais contendo ou não fragmento amplificado com os *primers* *fegA* em *B. elkanii* SEMIA 587 (1 à 10). A canaleta de número 11 representa o controle positivo da PCR (DNA plasmidial de *pfegA5079*). Como marcador de peso molecular foi utilizado 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen®) (12). Os asteriscos indicam as bandas de interesse e os respectivos plasmídeos escolhidos para seqüenciamento: *pfegA587.2* (2), *pfegA587.4* (4), *pfegA587.5* (5), *pfegA587.6* (6) e *pfegA587.7* (7).

**Tabela 5:** Seqüências referentes aos plasmídeos *pfegA587.2*, *pfegA587.4*, *pfegA587.5*, *pfegA587.6* e *pfegA587.7* e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).

Fragmento	BLASTn/NCBI	% Identidade	Categoria funcional
<i>pfegA587.2</i> (608pb)	<i>amiC: putative aliphatic amidase expression-regulating Rhodopseudomonas palustris BisB5</i> (acesso CP000283.1)	42%	proteína ligante e de transporte
<i>pfegA587.4</i> (271 pb)	<i>blr2632: putative adenylate cyclase B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	68%	ribonucleotídeos da biossíntese de purinas
<i>pfegA587.5</i> (365 pb)	<i>conserved hypothetical protein Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 (acesso CU234118.1)	73%	subunidade beta - síntese de ATP
<i>pfegA587.6</i> (494 pb)	<i>blr7256: putative adenylate cyclase B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	62%	ribonucleotídeos da biossíntese de purinas
<i>pfegA587.7</i> (561 pb)	<i>blr2939: glutathione S-transferase B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	48%	biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e/ou carreadores

Para o isolamento de um fragmento correspondente ao gene *fhuA*, foram utilizados o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 com os *primers fhuA* REV e *fhuA* FOR\_ elk e os DNAs de *B. japonicum* SEMIA 5079 e USDA110 com os *primers fhuA* REV e *fhuA* FOR\_jap. O fragmento esperado, com tamanho aproximado de 400 pb, foi corretamente obtido na amplificação com os DNAs das três estirpes (Figura 13).



**Figura 13:** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da PCR com os *primers fhuA* específicos, utilizando-se como molde os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587 (2), *B. japonicum* SEMIA 5079 (3) e *B. japonicum* USDA110 (4). Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III (1). Os asteriscos indicam a presença da banda de interesse na amplificação com o DNA das três estirpes analisadas.

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação com os *primers fhuA* específicos em *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079, foram diretamente clonados no vetor pGEM-T Easy, utilizado para transformação de *E. coli* XL1-Blue. Dez colônias brancas de cada uma das transformações foram analisadas por PCR com os *primers* M13/pUC reverso e direto e por clivagem com a enzima *Eco*RI, que libera o inserto clonado no vetor pGEM-T Easy.

Os plasmídeos denominados *pfhuA587* e *pfhuA5079* foram enviados para seqüenciamento. As seqüências obtidas foram analisadas em banco de dados (BLASTn/NCBI) e alinhadas com a seqüência do gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 (Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0) (Figura 14).

O alinhamento entre a seqüência de aminoácidos derivada da tradução do fragmento gênico *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e as proteínas correspondentes aos genes *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 e *fegA* de *B. japonicum* 61A152, estão ilustradas na Figura 15 (a) e (b), respectivamente.



A análise de identidade dos fragmentos gênicos *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 com genes de interesse, assim como a análise das seqüências de aminoácidos derivadas da tradução destes fragmentos com as proteínas correspondentes, estão descritas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. As análises de similaridade e identidade foram feitas com uso dos programas BLASTn/NCBI, BLASTp/NCBI (*Pairwise alignment*), Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

**Tabela 6:** Identidade de nucleotídeos entre as seqüências dos fragmentos correspondentes aos genes *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 com genes relacionados.

% Identidade com:					
Genes	<i>fhuA</i> 587	<i>fegA</i> 5079	<i>blr4504</i> <sup>a</sup>	<i>fhuA</i> <sup>b</sup>	<i>fegA</i> <sup>c</sup>
<i>blr4504</i> <sup>a</sup>	76	53			
<i>fhuA</i> <sup>b</sup>	50	47	49		
<i>fegA</i> <sup>c</sup>	56	96	55	49	
<i>bll4920</i> <sup>d</sup>	58	84	56	49	83

Seqüências comparadas por BLASTn/NCBI, Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

*fhuA* 587: correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587

*fegA* 5079: correspondente ao fragmento *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079

*blr4504*<sup>a</sup>: correspondente ao gene *tonB-dependent receptor-blr4504* de *B. japonicum* USDA110

*fhuA*<sup>b</sup>: correspondente ao gene *fhuA* de *R. leguminosarum*

*fegA*<sup>c</sup>: correspondente ao gene *fegA* de *B. japonicum* 61A152

*bll4920*<sup>d</sup>: correspondente ao gene *ferric iron receptor-bll4920* de *B. japonicum* USDA110

**Tabela 7:** Similaridade e identidade entre as seqüências de aminoácidos derivadas da tradução dos fragmentos correspondentes aos genes *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 com proteínas receptoras de sideróforos relacionadas.

% Similaridade ou Identidade com:						
Proteínas	FhuA 587	Blr4504 <sup>a</sup>	FhuA <sup>b</sup>	FegA 5079	FegA <sup>c</sup>	Bll4920 <sup>d</sup>
FhuA 587		78	54	X	61	61
Blr4504 <sup>a</sup>	<b>68</b>		48	53	55	58
FhuA <sup>b</sup>	<b>40</b>	<b>34</b>		45	49	47
FegA 5079	<b>X</b>	<b>41</b>	<b>35</b>		100	91
FegA <sup>c</sup>	<b>43</b>	<b>39</b>	<b>34</b>	<b>100</b>		91
Bll4920 <sup>d</sup>	<b>43</b>	<b>42</b>	<b>33</b>	<b>85</b>	<b>84</b>	

Identidade destacada em negrito e similaridade com fonte normal.

Seqüências comparadas por BLASTp/NCBI (*Pairwise alignment*), Clustal X 1.81 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0.

FhuA 587: correspondente ao fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587

Blr4504<sup>a</sup>: correspondente ao gene *tonB-dependent receptor-blr4504* de *B. japonicum* USDA110

FhuA<sup>b</sup>: correspondente ao gene *fhuA* de *R. leguminosarum*

FegA 5079: correspondente ao fragmento *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079

FegA<sup>c</sup>: correspondente ao gene *fegA* de *B. japonicum* 61A152

Bll4920<sup>d</sup>: correspondente ao gene *ferric iron receptor-bll4920* de *B. japonicum* USDA110

### 4.3 Hibridização dos genomas de *B. elkanii* e *B. japonicum* com as sondas correspondentes aos genes *fegA* e *fhuA*

A fim de identificar a presença, posição e número de cópias dos genes *fegA* e *fhuA* no genoma de *B. elkanii* SEMIA 587, experimentos de hibridização foram realizados utilizando-se como sonda os fragmentos *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587.

Em todos os experimentos utilizou-se, a fim de comparação e como controle, o genoma das estirpes SEMIA 5079 e USDA110 de *B. japonicum*. Foram escolhidas endonucleases de restrição que não apresentassem sítios de clivagem nas seqüências de interesse: *fegA* de *B. japonicum* 61A152, *bll4920* de *B. japonicum* USDA110, *blr4504* de *B. japonicum* USDA110, fragmento *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 e fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 e de *B. japonicum* SEMIA 5079. As enzimas utilizadas foram *ApaI*, *HindIII* e *KpnI*.

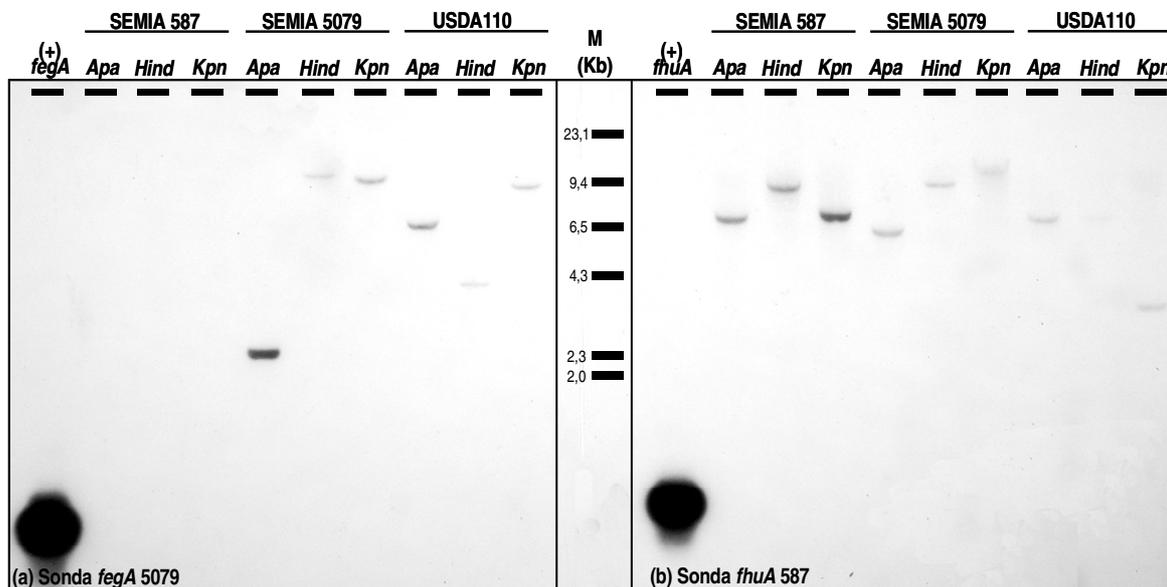
Uma vez que *fegA* e *fhuA* são genes com alta percentagem de identidade nucleotídica, a possibilidade de hibridização inespecífica do fragmento correspondente ao gene *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 com o gene *fhuA* de *B. elkanii* deveria ser identificada, caso ocorresse. Dessa forma, em ambos os experimentos de hibridização foram tomados os cuidados necessários para que não houvesse diferença de clivagem ou corrida entre os fragmentos obtidos pela digestão dos genomas, nem aos procedimentos de hibridização.

Segundo o padrão de hibridização obtido com a sonda *fegA*, observa-se a ausência desse gene no genoma de *B. elkanii* SEMIA 587 [Figura 16 (a)]. Em relação aos genomas de SEMIA 5079 e USDA110 de *B. japonicum*, os fragmentos hibridizados são de diferentes tamanhos, mas o número de cópias é o mesmo: ambos possuem uma única cópia do gene *fegA* em seu genoma.

Na hibridização com a sonda *fhuA*, todos os genomas apresentaram diferença em relação ao tamanho dos fragmentos, assim como presença de cópia única [Figura 16 (b)].

Através da comparação entre os experimentos, pôde-se concluir que a sonda *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 não possui identidade suficiente com o gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 para ocorrência de hibridização inespecífica. As sondas utilizadas nesse experimento foram bons marcadores para indicar a presença de ambos os genes nas

estirpes SEMIA 5079 e USDA110 de *B. japonicum*, e de apenas um deles, *fhuA*, no genoma de *B. elkanii* SEMIA 587.

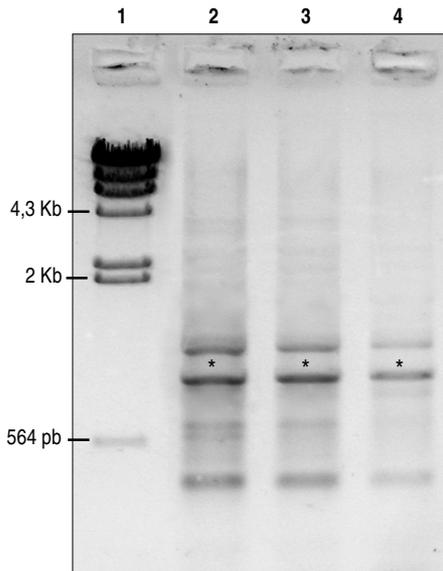


**Figura 16:** Auto-radiografia mostrando o padrão de hibridização obtido com as sondas correspondentes aos fragmentos *fegA* de *B. japonicum* SEMIA 5079 (a) e *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 (b) com os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* USDA110 digeridos com as enzimas de restrição *Apa*I, *Hind*III e *Kpn*I (conforme indicado na figura acima). M indica marcador de peso molecular (DNA de fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III).

#### 4.4. Estratégias empregadas para o isolamento de regiões adjacentes ao fragmento amplificado do gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587

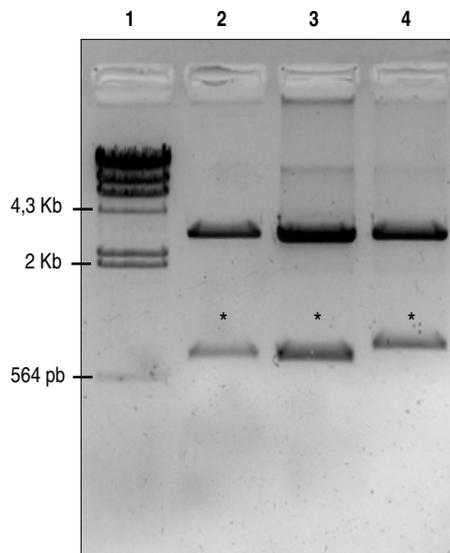
Objetivando o isolamento de uma região maior do gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, bem como de sua região reguladora, diversas estratégias foram empregadas em diferentes ocasiões, destacando-se as seguintes: projeção de novos *primers*, *SiteFinding* PCR e biblioteca genômica parcial.

Primeiramente, novos *primers* específicos foram desenhados. O novo *primer* reverso (*fhuA* REV\_novo) foi projetado de acordo com a própria sequência *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, enquanto que o novo *primer* direto (*fhuA* FOR\_novo) foi projetado segundo o alinhamento entre genes relacionados (Figura 3). Após padronização das reações de PCR com o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, um fragmento com tamanho aproximado de 750 pb foi obtido (Figura 17).



**Figura 17:** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da PCR com os novos *primers fhuA* projetados (*fhuA* REV\_novo e *fhuA* FOR\_novo) utilizando-se como molde diferentes concentrações de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 (70, 50 e 10 ng/μL) (canaletas 2, 3 e 4 respectivamente). Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de fago λ clivado com *HindIII* (1). Os asteriscos indicam a presença da banda de interesse.

A banda de interesse foi purificada do gel de agarose e ligada no vetor pGEM-T Easy, utilizado para transformação de *E. coli* XL1-Blue. Entre os clones positivos, três foram escolhidos por liberarem bandas de tamanho esperado após clivagem com a enzima *EcoRI* (Figura 18). Os plasmídeos denominados pNovofhuA587.1, pNovofhuA587.2 e pNovofhuA587.3 foram enviados para seqüenciamento. As seqüências obtidas foram analisadas em banco de dados (BLASTn/NCBI), entretanto, nenhuma delas apresentou similaridade com o gene *fhuA* de *R. leguminosarum* nem com o gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110. Os resultados observados em banco de dados estão descritos na Tabela 8.

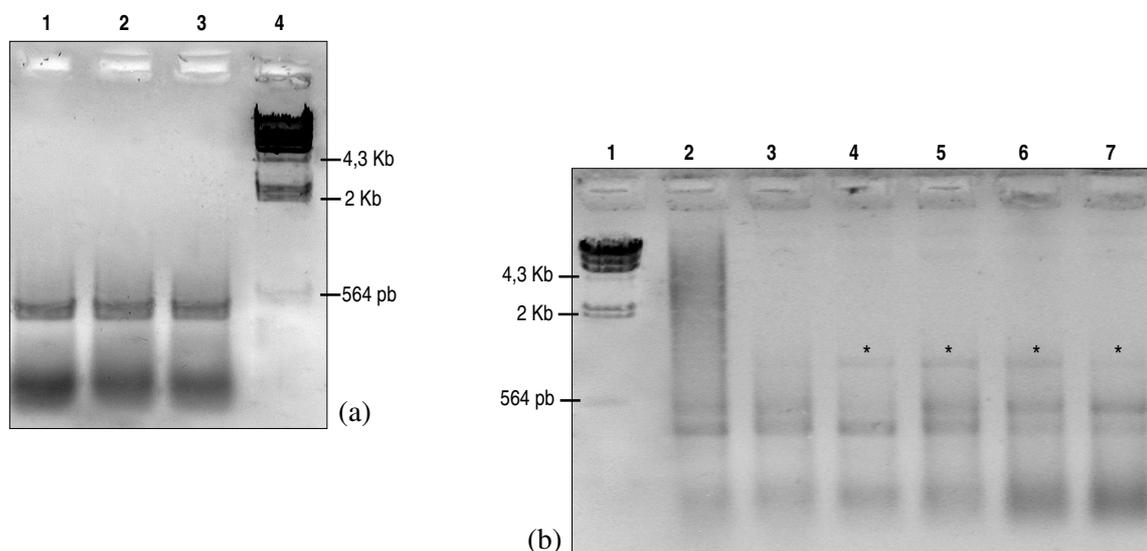


**Figura 18:** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da clivagem dos plasmídeos pNovofhuA587.1 (2), pNovofhuA587.2 (3) e pNovofhuA587.3 (4) com a enzima *EcoRI*, com liberação das bandas de tamanho esperado, de aproximadamente 750 pb (marcadas com asterisco). As bandas de interesse são produtos de amplificação com os *primers fhuA* REV\_novo e *fhuA* FOR\_novo (utilizando-se como molde o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587) clonados no vetor pGem-T Easy. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ clivado com *HindIII* (1).

**Tabela 8:** Seqüências referentes aos plasmídeos pNovofhuA587.1, pNovofhuA587.2 e pNovofhuA587.3 e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).

Fragmento	BLASTn/NCBI	% Identidade	Categoria funcional
pNovofhuA587.1 (695 pb)	<i>bll2850: probable 6-phosphofructokinase</i> <i>B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	55%	glicólise
pNovofhuA587.2 (442 pb)	<i>Enoyl-CoA hidratase</i> <i>Burkholderia vietnamiensis</i> (acesso CP000651.1)	73%	proteína da família luciferase
pNovofhuA587.3 (719 pb)	<i>glk: glucokinase</i> <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 (acesso CP000494.1)	57%	glicólise

Tentativas de obtenção da região reguladora do gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 através da técnica de *SiteFinding* também foram realizadas. As condições de PCR foram diversas vezes alteradas, mas fragmentos de tamanho molecular em torno de 500 pb eram continuamente amplificados de forma preferencial [Figura 19 (a)]. Após adaptações, bandas de aproximadamente 1000 pb foram obtidas [Figura 19 (b)] e clonadas no vetor pGEM-T Easy, utilizado para transformação de *E. coli* XL1-Blue. Dois clones foram enviados para seqüenciamento (pSFfhuA587.1 e pSFfhuA587.2).



**Figura 19:** Géis de agarose 1% mostrando os resultados obtidos com a técnica de *SiteFinding* PCR utilizando-se DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 e *primers* específicos para o gene *fhuA* (*fhuA* REV\_novo e *fhuA* REV\_maior). Em (a) fragmentos de tamanho molecular em torno de 500 pb em reações com 20, 50 e 100 ng/μL de DNA (1, 2 e 3 respectivamente), advindos da reação secundária de *Nested* PCR diluída 50 X; DNA de fago λ clivado com *Hind*III como marcador de peso molecular (4). Em (b), além de fragmentos menores, bandas com cerca de 1000 pb foram obtidas: reações com 20 ng/μL de DNA (4 e 7), 50 ng/μL de DNA (3 e 6) e 100 ng/μL de DNA (2 e 5), advindos diretamente da reação secundária de *Nested* PCR (2, 3 e 4) ou desta diluída 50 X (5, 6 e 7); DNA de fago λ clivado com *Hind*III como marcador de peso molecular (1). Os asteriscos indicam as bandas de interesse purificadas do gel de agarose.

As seqüências obtidas foram analisadas (BLASTn/NCBI) e não correspondiam ao gene de interesse. Os resultados observados em banco de dados estão descritos na Tabela 9.

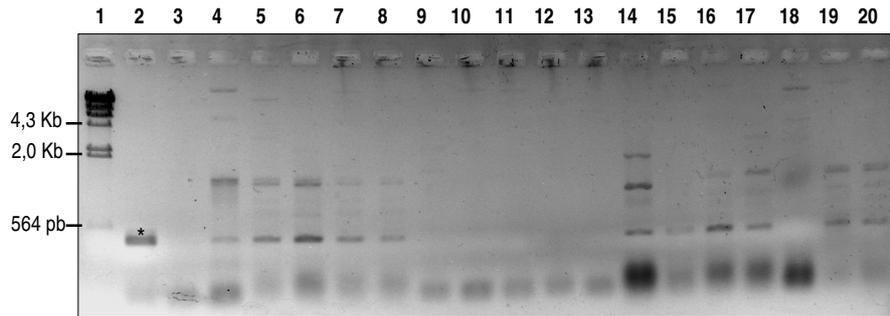
**Tabela 9:** Seqüências referentes aos plasmídeos pSF*fhuA*587.1 e pSF*fhuA*587.2 e a identidade observada em banco de dados (BLASTn/NCBI).

Fragmento	BLASTn/NCBI	% Identidade	Categoria funcional
pSF <i>fhuA</i> 587.1 (558 pb)	<i>bll0993</i> : ABC transporter peptide-binding protein <i>B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	38%	proteína ligante e de transporte
pSF <i>fhuA</i> 587.2 (681 pb)	<i>bll0993</i> : ABC transporter peptide-binding protein <i>B. japonicum</i> USDA110 (acesso BA000040.2)	39%	proteína ligante e de transporte

A última estratégia empregada com a finalidade de obter-se a região 5' de *fhuA* de SEMIA 587 foi a construção de uma biblioteca genômica parcial de *B. elkanii*, enriquecida com fragmentos contendo essa região completa. Como os resultados obtidos no experimento de Southern blot genômico com as enzimas *ApaI*, *HindIII* e *KpnI* (subitem 4.3) apresentaram hibridização de fragmentos de tamanhos relativamente grandes e de difícil clonagem (aproximadamente 6.5, 9.5 e 7.0 Kb, respectivamente), novos experimentos foram realizados. De acordo com os resultados observados, utilizando-se a sonda *fhuA* com o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 clivado com *EcoRI*, a banda resultante da hibridização apresentou aproximadamente 4,0 Kb (dados não mostrados).

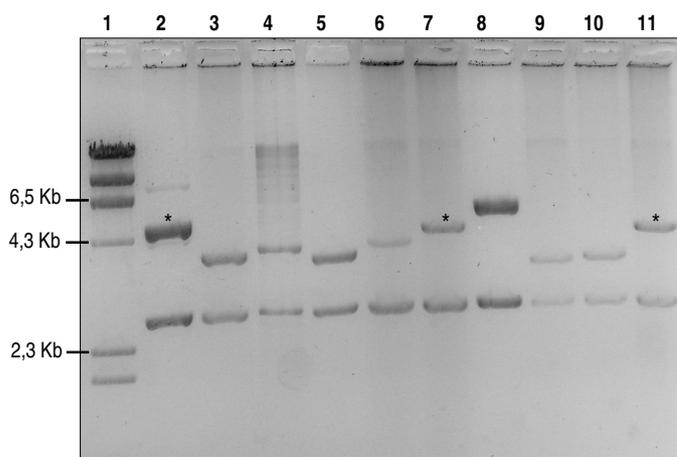
Uma vez que o gene *blr4504* (correspondente à *fhuA*) de *B. japonicum* USDA110 apresenta um tamanho de aproximadamente 2,3 Kb, a possibilidade do gene *fhuA* completo de *B. elkanii* estar presente no fragmento de 4,0 Kb é possível. A clonagem da região correspondente à banda de 4,0 Kb/*EcoRI* em pUC18/*EcoRI* rendeu aproximadamente 1000 colônias brancas. Todas colônias foram analisadas através de hibridização com a sonda *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587.

Dezoito colônias, que apresentaram melhor sinal de hibridização, tiveram seus plasmídeos extraídos e, posteriormente, clivados com a enzima *EcoRI* e submetidos a reações de PCR com os primers *fhuA* (*fhuA* REV e *fhuA* FOR\_ellk). Porém, o fato de *E. coli* também possuir gene *fhuA*, provavelmente interferiu na análise dos resultados. A maioria dos produtos de PCR apresentou bandas de tamanho esperado para *fhuA* (Figura 20).



**Figura 20:** Gel de agarose 1% mostrando o resultado da PCR com os primers *fhuA* (*fhuA* REV e *fhuA* FOR\_ek) utilizando-se como molde DNA plasmidial extraído das colônias bacterianas que apresentaram melhores sinais de hibridização nos experimentos relacionados à biblioteca genômica parcial de *B. elkanii* SEMIA 587. O DNA genômico de SEMIA 587 foi utilizado como controle positivo (2) (banda marcada com asterisco). Bandas de tamanho esperado foram encontradas em 11 das reações (canaletas 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 19 e 20). Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III (1).

Dessa forma, dos dezoito plasmídeos, dez foram escolhidos para transferência do DNA plasmidial clivado com *Eco*RI (Figura 21) para membrana, seguido de hibridização com a sonda *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587. Três plasmídeos (referentes às canaletas de números 4, 14 e 17 da Figura 20) continham fragmentos de aproximadamente 4,0 Kb. Caso as bandas correspondentes a esses plasmídeos contivessem o gene *fhuA* (canaletas de números 2, 7 e 11 da Figura 21), um forte sinal de hibridização seria identificado, porém, nenhuma das construções analisadas forneceu o resultado esperado (dados não mostrados).

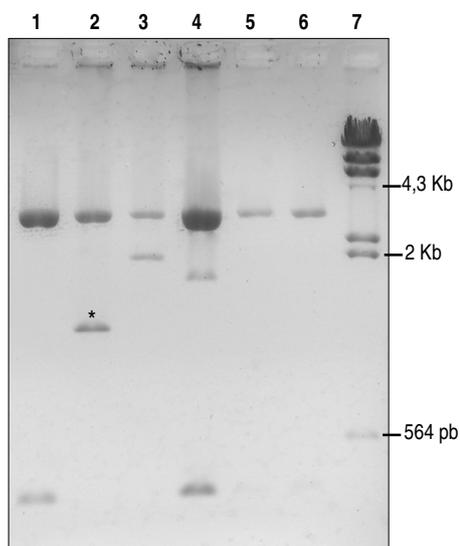


**Figura 21:** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da clivagem com *Eco*RI de dez dos dezoito plasmídeos extraídos das colônias bacterianas que apresentaram melhores sinais de hibridização nos experimentos relacionados à biblioteca genômica parcial de *B. elkanii* SEMIA 587 e que, apresentaram resultados positivos para a PCR com os primers *fhuA*. Os plasmídeos 4, 14 e 17 (canaletas 2, 7 e 11 respectivamente) apresentaram bandas de tamanhos aproximado à 4,0

Kb (marcadas com asterisco). DNA de fago  $\lambda$  clivado com *Hind*III usado como marcador de peso molecular (1). O gel de agarose com essa clivagem foi transferido para membrana submetida a experimento de hibridização com a sonda *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587.

#### 4.5 Construção de mutantes nulos de *B. elkanii* SEMIA 587 para o gene *fhuA*, utilizando-se cassete *gfp* e cassete *gfp/Sm/Sp*

Para a obtenção de linhagens mutantes de *B. elkanii* com o gene *fhuA* interrompido, inicialmente o plasmídeo *pfhuA587* foi clivado com a enzima *NruI*, a qual possui um sítio único de restrição no fragmento *fhuA* correspondente. O cassete *gfp*, obtido pela clivagem do vetor pHGWF57 com *SacII* e *NruI*, foi tratado com *Klenow* DNA *Polymerase* I, para que os dois nucleotídeos remanescentes da clivagem com *SacII*, fossem retirados pela atividade de exonuclease 3'-5' da enzima. Com ambas extremidades cegas (*blunt-ended*), o cassete *gfp* foi ligado no sítio de *NruI* de *pfhuA587*. Plasmídeos foram extraídos de dezoito colônias brancas e, entre esses, cinco apresentaram maior peso molecular do que *pfhuA587* e foram clivados com a enzima *EcoRI*. O plasmídeo denominado *pfhuA587gfp*, que liberou uma banda de 3,0 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) e uma de aproximadamente 1,2 Kb (correspondente ao fragmento *fhuA* interrompido pelo cassete *gfp*), foi enviado para seqüenciamento (Figura 22, canaleta 2).



**Figura 22:** Gel de agarose 1% apresentando o resultado da clivagem dos plasmídeos com *EcoRI*. Canaletas 2 a 6, plasmídeos *pfhuA587* contendo ou não o gene *gfp* ligado no sítio *NruI* do fragmento *fhuA*. A clonagem correta do cassete *gfp* em *pfhuA587* é observada no plasmídeo *pfhuA587gfp* (canaleta 2), onde uma banda de aproximadamente 1,2 Kb [(marcada com asterisco) correspondente ao fragmento *fhuA* interrompido pelo cassete *gfp*] e uma banda de 3,0 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) são visualizadas. Como controle positivo, utilizou-se a clivagem de *pfhuA587* com *EcoRI* (1), onde observa-se a banda de 3,0 Kb do vetor pGEM-T Easy e a banda de aproximadamente 400 pb referente ao fragmento *fhuA*. Os demais plasmídeos (3, 4, 5 e 6) não apresentaram tamanhos esperados de insertos liberados na clivagem. Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *HindIII* (7).

A seqüência obtida de *pfhuA587gfp* confirmou a inserção do cassete e, sobretudo, a correta orientação e posição dos nucleotídeos para fase correta de leitura de *gfp* (Figura 23). Após confirmação da clonagem de *pfhuA587gfp*, o plasmídeo foi clivado com *NruI*, que cliva entre o final do gene *gfp* e a segunda metade (de 187 pb) do fragmento *fhuA* interrompido. Posteriormente, o cassete *Sm/Sp*, obtido a partir da clivagem do vetor pHP45 $\Omega$  com a enzima *SmaI*, foi inserido no sítio de *NruI* de *pfhuA587gfp*.

```

> pfhuA587gfp_M13 REV
CTGTTTCGGCCTCGACTACCGCAACACCTCGTTCCGGCGACATGGCCTCGAGCTACAGCACCGGCAAGCTCAACG
TCTTCGCGCCGGTCTATACCAACAGCTGGATCAACAACGGACCGTATGACGACACCGGCATCAAGCAGTCGCA
GGCCGGCCTCTATCTGCAGGACCAGATCAGGCTCGGACGGCTGTCGTTCTGCTCGGGGGGGCGGCAGGATTTTC
GTCACCACCGACCTCGACAACAATCTCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGCCCA
TCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
CTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACC
ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGC TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG
CCATGCCC GAATGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAGGACGACGGCACTACAGACCCGCGCCGAGG
GTGAAGTTCGAGGGCGACACCC TGGTGAACGCATCGAGCTGAGGCATCGACTTCAGGAGGACGGCACATCTGG
GCACAAAGCTGGAGTAACTCCACAGCCCACGTCTATTTTTATGCCGACAGCAAGAGAATCGCATCAGGTGACTT
CAGATCGCCACACTCGACG

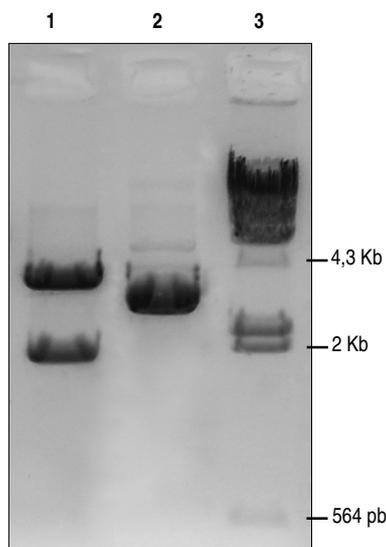
```

Em preto: parte inicial de *fhuA* 587

Em cinza: parte inicial do gene *gfp*

**Figura 23:** Parte da seqüência de *pfhuA587gfp*, contendo o início do fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 (nucleotídeos destacados em preto), seguido do cassete *gfp* (nucleotídeos destacados em cinza), obtida a partir do seqüenciamento com o *primer* M13 reverso. As fases corretas de leitura de *fhuA* e *gfp* estão destacadas pela alternância de códons com e sem negrito. Observa-se que o códon inicial do gene *gfp* (ATG sublinhado), entrou em fase de leitura correta com a seqüência de *fhuA*.

O DNA plasmidial extraído de uma colônia branca foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. A clivagem com *EcoRI* libera bandas de aproximadamente 3,0 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) e 3,2 Kb (correspondente ao fragmento *fhuA* interrompido pelo cassete *gfp/Sm/Sp*), difíceis de serem diferenciadas pela análise do gel. A digestão com *HindIII*, entretanto, libera a banda referente ao cassete *Sm/Sp* (aproximadamente 2,0 Kb) e um fragmento de cerca de 4,2 Kb correspondente ao vetor pGEM-T Easy (que não possui sítio para *HindIII*) e ao fragmento *fhuA* interrompido pelo gene *gfp* (Figura 24). Tal plasmídeo foi chamado *pfhuA587gfp/Sm/Sp*.



**Figura 24:** Gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da clivagem do plasmídeo *pfhuA587gfp* com o cassete *Sm/Sp* ligado no sítio *NruI*, com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. A clonagem correta é observada pela liberação de bandas de 2,0 Kb (referente ao cassete *Sm/Sp*) e 4,2 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy e ao fragmento *fhuA* interrompido pelo gene *gfp*) (canaleta 1) na digestão com *HindIII* e pelas bandas de 3,0 Kb (correspondente ao vetor pGEM-T Easy) e 3,2 Kb (correspondente ao fragmento *fhuA* interrompido pelo cassete *gfp/Sm/Sp*) na clivagem com *EcoRI* (canaleta 2). Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA de fago  $\lambda$  clivado com *HindIII* (3).

A seqüência de *pfhuA587gfp/Sm/Sp* mostra a clonagem correta do cassete *Sm/Sp* ao final do gene *gfp* (Figura 25).

(a)

```
> pfhuA587gfp/Sm/Sp_M13 REV
CTGTTTCGGCCTCGACTACCGCAACACCTCGTTCCGCGACATGGCCTCGAGCTACAGCACCGGCAAGCTCAACG
TCTTCGCGCCGGTCTATACCAACAGCTGGATCAACAACGGACCGTATGACGACACCGGCATCAAGCAGTCGCA
GGCCGGCCTCTATCTGCAGGACCAGATCAGGCTCGGACGGCTGTCGTTCCCTGCTCGGGCGGGCGGCAGGATTC
GTCACCACCTGACCTCGACAACAATCTCGGGATGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCA
TCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
CTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACC
ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG
CCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGGGCGCACATCTTCTCAATGGACGATTGCAACTACAAGACTCCGCTGA
GGTGAAGTCGAGGGCGACATCCTTGGTGACGCCCTCGGGTGAAGGCATCGACTTCAAGAGGACGCACATTCCTG
GGCACCCTGGATATCATCTACCAACGGCTTTAAGGTCTA
```

Em preto e negrito: parte inicial de *fhuA* 587

Em cinza: parte inicial do gene *gfp*

(b)

```
> pfhuA587gfp/Sm/Sp_M13 FOR
TACTTCACGCGAGTTTCGTCCTGGAGCCAGGACTGCGATCCCTTGGCCGTCTGCGTGATGCTCAGCACCGGC
AAAAGTTCCGAATAGCTGAAATAGGGCGCGATGCCATTGTCGAAATTGTACATGACGGCGGGCGGGCCGGTG
AATGCCGAAGCATCGGTGAGGTCGACGTCCTTCGGGGGATCCGGTGATTGATTGAGCAAGCTTTATGCTTCGT
AAACCGTTTTGTGAAAAAATTTTTAAAAATAAAAAAGGGTTAAAGGTCATTCCAAAGGTCATCCACGGGATCAA
TTCCCTGTTCCCGCGGGTGGGTGCCAGCTCTCGGGTAACATAAGGGCCCGTTCCTTGGAACCTTGCCCTCCCC
ACGAGATTGTGGCGTAACGAATCCAATCCTTACCCGAATTGCCAACCCCCCTGATCGCTGGGCCGTTCCAAAA
AACTGGGGCAACAAACAGGCCTCTTCCCGAAAACCCCCAAAGCCAAGGTTTCCATTTCGAAACAGGGGAAATC
GTGCACACCTTGCTAAAAAAGGGCCCTAGT
```

Em preto e negrito: parte final de *fhuA* 587

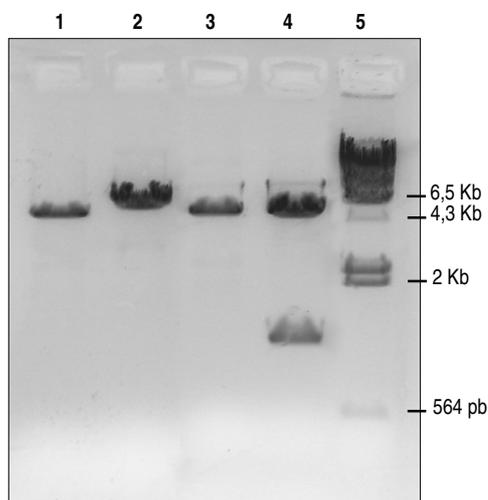
Em cinza: parte final do interposon ômega com cassete *Sm/Sp*

**Figura 25:** (a) Parte da seqüência de *pfhuA587gfp/Sm/Sp*, contendo o início do fragmento *fhuA* de SEMIA 587 (nucleotídeos destacados em preto/negrito), seguido do cassete *gfp* (nucleotídeos destacados em cinza), no seqüenciamento com o *primer* M13 reverso. No seqüenciamento com o *primer* M13 direto (b), observa-se a presença da parte final do fragmento *fhuA* de SEMIA 587 (invertido nesta representação) (nucleotídeos destacados em preto/negrito), seguido da seqüência correspondente ao interposon ômega com cassete *Sm/Sp* (nucleotídeos destacados em cinza).

Posteriormente, os plasmídeos *pfhuA587gfp* e *pfhuA587gfp/Sm/Sp* foram clivados com *EcoRI* para liberação dos insertos. Os fragmentos *fhuA587gfp* e *fhuA587gfp/Sm/Sp* foram purificados do gel de agarose e clonados no sítio de *EcoRI* do vetor conjugativo pK19*mobsacB*. A confirmação da clonagem foi feita através da clivagem dos plasmídeos chamados pK*fhuA587gfp* e pK*fhuA587gfp/Sm/Sp* com diferentes enzimas de restrição (ver Figuras 26 e 27, respectivamente).

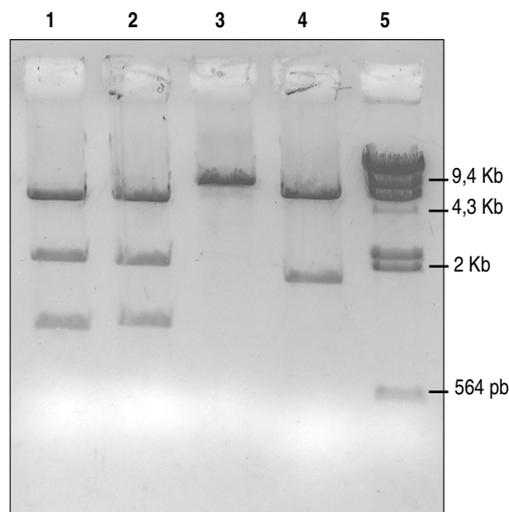
O resultado do seqüenciamento de pK*fhuA587gfp* e pK*fhuA587gfp/Sm/Sp* confirmou as observações feitas pelos experimentos de clivagem, e os plasmídeos

finalmente puderam ser utilizados para inserção em *B. elkanii* SEMIA 587, por conjugação ou transformação por choque térmico, em experimentos distintos.



**Figura 26:** Gel de agarose 0,8% mostrando o plasmídeo pKfhuA587gfp clivado com *Hind*III (2) e *Eco*RI (4), usando-se como controle o vetor pK19mobsacB linearizado pela clivagem com *Hind*III (1) e *Eco*RI (3), apresentando banda de aproximadamente 5,7 Kb. As bandas liberadas por pKfhuA587gfp clivado com *Hind*III (2) mostram a linearização do plasmídeo pela visualização da banda de aproximadamente 6,9 Kb (5,7 Kb do vetor pK19mobsacB e 1,2 Kb de *fhuA* interrompido por *gfp*); na clivagem de pKfhuA587gfp com *Eco*RI (4), observa-se as bandas de 5,7 Kb (pK19mobsacB) e 1,2 Kb (*fhuA* interrompido por *gfp*). Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA de fago λ clivado com *Hind*III (5).

**Figura 27:** Gel de agarose 0,8% mostrando o plasmídeo pKfhuA587gfp/Sm/Sp clivado com *Bam*HI (1), *Hind*III (2), *Pst*I (3) e *Sal*I (4). Na clivagem com *Bam*HI e *Hind*III, bandas de aproximadamente 5,9 Kb (pK19mobsacB e fragmento *fhuA*), 2,0 Kb (cassete *Sm/Sp*) e 1,0 Kb (*gfp* e fragmento *fhuA*); com *Pst*I, linearização do vetor com tamanho aproximado de 8,9 Kb e com *Sal*I, banda de cerca de 6,0 Kb (pK19mobsacB e fragmento *fhuA*) e 3,0 Kb (*gfp* e fragmento *fhuA* mais cassete *Sm/Sp*). Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA de fago λ clivado com *Hind*III (5).



Para a transferência das construções por choque térmico, células termo-competentes de *B. elkanii* SEMIA 587 foram preparadas de acordo com método de Vincze & Bowra (2006), com algumas modificações. Os plasmídeos foram separadamente utilizados para transformação e as bactérias foram selecionadas em meio LM contendo canamicina (na transformação com pKfhuA587gfp) e canamicina, espectinomicina e estreptomicina (na transformação com pKfhuA587gfp/Sm/Sp). Nessa etapa, as colônias de

SEMIA 587 multiplicadas em placa de Petri com antibiótico foram chamadas de primeira geração.

Para a inserção de pK*fhuA587gfp* ou pK*fhuA587gfp/Sm/Sp* em *B. elkanii* SEMIA 587 via conjugação com *E. coli*, fez-se uso de conjugação triparental. Dessa forma, utilizou-se além de *B. elkanii* e *E. coli* XL1-Blue contendo a construção de interesse, *E. coli* XL1-Blue com o plasmídeo pRK2013, o qual contém os genes necessários para transferência plasmidial via conjugação. Nos tempos de 48, 72 e 96 horas pós-conjugação, realizou-se a primeira seleção de trans-conjugantes em meio LM com ampicilina, marca de resistência cromossômica de *B. elkanii*. Além de ampicilina, o meio para seleção pós-conjugação com pK*fhuA587gfp* continha canamicina, e no caso de pós-conjugação com pK*fhuA587gfp/Sm/Sp*, estreptomicina e espectinomicina. Nessa etapa, as colônias de SEMIA 587 multiplicadas em placa de Petri com antibiótico também foram chamadas de primeira geração, assim como citado acima.

As etapas sucessivas de seleção estão sendo conduzidas conforme descrito no subitem 3.11 do Material e Métodos. Após obtenção de bactérias de *B. elkanii* SEMIA 587 mutantes para o gene *fhuA*, experimentos de nodulação e competição serão realizados com essa estirpe mutante.

## 5 Discussão

Em vista da participação do ferro em processos biológicos essenciais, a produção de sideróforos é uma característica que confere vantagens à sobrevivência de microrganismos nos mais diversos ambientes, sendo um importante fator de competição microbiana (Lynck *et al.*, 2001). Para os diazotróficos, o ferro ainda é fundamental na formação do complexo enzimático da nitrogenase, uma vez que as proteínas envolvidas na fixação biológica do nitrogênio requerem o ferro como cofator (Dixon & Kahn, 2004). Além disso, a indisponibilidade de ferro pode afetar a simbiose entre rizóbios e leguminosas, uma vez que as bactérias precisam se manter no solo até o momento da nodulação. Dentro do nódulo, mais especificamente, a importância do ferro também é destacada por sua presença na leg-hemoglobina, molécula que atua na regulação de oxigênio (Yeoman *et al.*, 2003). Entretanto, a produção de sideróforos por bactérias simbiotes parece ser mais importante para a sobrevivência e competição no solo, que em geral contém pouco ferro solúvel, do que para a fixação do nitrogênio (Khan *et al.*, 2006).

Os sistemas de captação de ferro estão bem caracterizados em bactérias como *E. coli* e *Pseudomonas* sp., mas ainda pouco se conhece entre as espécies de rizóbios. Dentre os sideróforos já identificados entre os rizóbios, destacam-se rizobactina e vicibactina. Rizobactina 1021 é um sideróforo do tipo hidroxamato produzido por *Sinorhizobium meliloti*, que requer o operon *rhbABCDE* para sua biossíntese (Lynch *et al.*, 2001). Vicibactina, um sideróforo tri-hidroxamato cíclico, produzido por *R. leguminosarum*, é expresso por um agrupamento composto de oito genes: *vbsGSO*, *vbsADL*, *vbsC* e *vbsP* (Dilworth *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 2002). A produção de ‘schizokinen’, um sideróforo do tipo di-hidroxamato produzido por *Bacillus megaterium*, foi identificada na linhagem IARI 917 de *R. leguminosarum* (Storey *et al.*, 2006). Sideróforos do tipo catecolato são produzidos por diferentes linhagens de *Rhizobium* sp. simbiotes de ervilha (Modi *et al.*, 1985), amendoim (Jadhav & Desai, 1992), *Cicer arietinum* (Roy *et al.*, 1994) e *Cajanus cajan* (Khan *et al.*, 2006). Muitos rizóbios também são capazes de utilizar compostos heme, hemoglobina e leg-hemoglobina como recurso de ferro (Noya *et al.*, 1997; Nienaber *et al.*, 2001).

Entre os bradirrizóbios, sabe-se que as linhagens 61A152 e USDA110 de *B. japonicum* são capazes de utilizar citrato (Guerinot *et al.*, 1990; Plessner *et al.*, 1993), mas somente 61A152 é capaz de secretá-lo. Citrato (ou ácido cítrico) não pertence às classes

funcionais de sideróforos mais comumente analisadas (hidroxamato e catecolato). Além disso, essas estirpes também são capazes de captar e transportar (mas não de secretar) ferricromo (sideróforo do tipo hidroxamato mais comumente produzido por fungos), ácido rodotorúlico (outro tipo hidroxamato produzido por fungos) e pseudobactina St3 (sideróforo do tipo pioverdina, produzido por espécies de *P. fluorescences*) (Plessner *et al.*, 1993). A estirpe USDA110 de *B. japonicum* não produz sideróforos (Boiero *et al.*, 2007). Em estudos de Khandelwal e colaboradores (2002), dentre sete estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas, uma de *B. japonicum* foi selecionada por produzir dois tipos de sideróforos: um hidroxamato e um catecolato. Para *B. elkanii*, entretanto, nenhum estudo específico quanto à produção de sideróforos ou sistemas de captação de ferro foi encontrado.

Em vista da importância biológica da captação de ferro via sideróforo e da utilização de rizóbios na agricultura, o estudo de tal mecanismo entre as estirpes de *B. elkanii* utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil foi realizado neste trabalho. Análises da produção de sideróforos, através do teste CAS em placas de Petri, indicaram que as estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 são produtoras de sideróforos, assim como outras cinco estirpes dessa espécie (Figura 8). Como comparação, dez estirpes de *B. japonicum*, entre elas duas que são utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, e a estirpe USDA110 que teve seu genoma sequenciado e é usada como inoculante em diversos outros países, foram analisadas. Das estirpes de *B. japonicum* analisadas, apenas duas são produtoras de sideróforos (SEMIA 6152 e SEMIA 6163), ao passo que as outras oito estirpes de *B. japonicum* não foram capazes de se multiplicar em meio deficiente em ferro, justamente por não produzirem sideróforos (Figura 8).

A ausência ou presença da produção de sideróforos entre diferentes estirpes de uma mesma espécie pode ser explicada por mecanismos de transferência gênica horizontal. Atualmente, a plasticidade dos genomas bacterianos tem sido alvo de diversos estudos (Dobrindt *et al.*, 2004; Kechris *et al.*, 2006; Barcellos *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2007; Zaied *et al.*, 2007). A característica 'produção de sideróforos' é expressa por agrupamentos gênicos complexos, que podem variar até mesmo entre microrganismos filogeneticamente relacionados. Exemplo disso é a identificação do agrupamento *ATS* na estirpe C58 de *Agrobacterium tumefaciens* (Rondon *et al.*, 2004). O agrupamento *ATS* apresenta quatro genes relacionados à síntese de um metabólito secundário com atividade de sideróforo e a linhagem mutante para esse agrupamento é incapaz de se multiplicar na ausência de ferro.

Nas regiões adjacentes ao agrupamento *ATS* encontram-se outros genes relacionados ao metabolismo de ferro, como, por exemplo, receptores dependentes de TonB e transportadores do tipo ABC. A análise das proteínas deduzidas a partir da tradução dos genes do agrupamento *ATS* demonstrou alta similaridade com proteínas relacionadas à cianobactéria *Nostoc* sp., de relativa distância filogenética de *A. tumefaciens*, em comparação a outros microrganismos produtores. Em contrapartida, o agrupamento *agb*, identificado em outra linhagem de *A. tumefaciens* [Sonoda *et al.*, (2002) in Rondon *et al.*, 2004], não está presente no genoma da estirpe C58.

Outro exemplo da variação entre estirpes é o de *P. aeruginosa*, bactéria na qual a produção do sideróforo pioverdina contribui como fator de virulência; mutantes que não produzem pioverdina apresentam virulência reduzida (Meyer *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 2006). Existem linhagens de *P. aeruginosa* produtoras e linhagens que não produzem sideróforos. Sobretudo, sabe-se que a produção de sideróforos é benéfica para esta espécie, visto que as estirpes produtoras apresentam altas taxas de densidade populacional quando comparadas às não-produtoras (Griffin *et al.*, 2004). A diferença de *fitness* entre bactérias produtoras e não-produtoras de sideróforos só é observada em meio com limitação de ferro (Ratledge & Dover, 2000).

Da mesma forma, a habilidade em utilizar sideróforos produzidos por outros microrganismos pode ser distinta entre populações de uma mesma espécie bacteriana. Uma população de *Mesorhizobium* foi analisada quanto à presença do sistema *fhuACDB* (Carlton *et al.*, 2007). Entre as dezessete linhagens observadas, apenas dez apresentaram hibridização positiva para o gene *fhuB*. Nenhuma das linhagens produz sideróforo e a capacidade de utilizar ferricromo, foi observada em apenas três delas, que também possuíam o gene *fhuA*. A análise do DNA de *M. loti* R88B revelou a presença de genes *fhu* em três loci distintos: locus 1 contendo os genes *fhuBD*; locus 2 contendo *fhuA*,  $\psi$ *fhuB2* e  $\psi$ *fhuD2* e locus 3 com o gene *fhuC* (a jusante dos genes *exbB*, *exbD* e *tonB* – complexo TonB transdutor de energia). Na comparação destes agrupamentos com o genoma sequenciado de *M. loti* MAFF303099, que não possui o operon *fhuACDB*, apenas as regiões adjacentes aos genes *fhu* apresentaram identidade acima de 80%. Segundo Carlton e colaboradores (2007), a ocorrência de genes *fhu* em três loci distintos e as diferenças entre linhagens é uma evidência de microevolução.

A transferência gênica horizontal [também chamada de transferência gênica lateral (Kechris *et al.*, 2006)] é um importante mecanismo para a evolução dos genomas microbianos. Elementos genéticos móveis, que influenciam traços como resistência a antibióticos, simbiose e *fitness*, são também chamados de ilhas genômicas (Dobrindt *et al.*, 2004). Ilhas genômicas que codificam genes relacionados à produção e/ou captação de sideróforos geralmente aumentam a adaptabilidade de bactérias do solo. Estas ilhas podem ser chamadas de ilhas de patogenicidade em se tratando de microrganismos patogênicos. Diversos sistemas de produção de sideróforos são codificados por plasmídeos que podem ser transferidos entre bactérias, aumentando a eficiência dos sistemas de captação de ferro através da aquisição de DNA exógeno (Dobrindt *et al.*, 2004). Dessa forma, a produção diferenciada de sideróforos entre as estirpes de *Bradyrhizobium* já citadas na literatura e aquelas analisadas nesse trabalho, poderia ser explicada por intermédio de transferência gênica. De qualquer forma, a capacidade de produzir sideróforos observada entre as estirpes de *B. elkanii* utilizadas como inoculantes no Brasil, é de relevância devido às vantagens que tal sistema pode oferecer à bactéria e à planta hospedeira.

Muitos dos mecanismos envolvidos na supressão de fito-patógenos por PGPRs estão relacionados à produção de antibióticos, competição por substrato e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Van Loon *et al.*, 1998). Diversos estudos mostram que PGPRs produtoras de sideróforos podem suprimir ou minimizar os efeitos danosos causados por microrganismos fito-patogênicos. Isolados de *Pseudomonas* sp. que produzem sideróforos, são conhecidos por suprimir a proliferação de fungos patogênicos do solo, devido à produção de anti-fúngicos e seqüestro de ferro III da rizosfera (Paulitz & Loper, 1991; Dwivedi & Johri, 2003). A adição de uma linhagem de *P. putida* produtora de sideróforos, reduziu significativamente a presença de *Fusarium* no solo, permitindo o desenvolvimento de três espécies vegetais (Scher & Baker, 1982). Além disso, algumas estirpes produtoras também são capazes de influenciar positivamente a interação entre rizóbios e leguminosas: em experimentos de co-inoculação de soja em meio com baixo conteúdo de ferro, três isolados de *P. fluorescences* aumentaram consistentemente o número de nódulos ocupados por *B. japonicum* USDA110 (Fuhrmann & Wollum, 1989).

A promoção de crescimento vegetal é influenciada indiretamente por PGPRs produtoras de sideróforos, devido à capacidade de captação dos íons férricos presentes na rizosfera e indisponibilidade desses para os fito-patógenos. A interação sinérgica entre

produção de sideróforos e de HCN (cianeto de hidrogênio), teve associação com atividade antifúngica de oito entre 66 bactérias isoladas de *C. arretinum*: seis estirpes de *Azotobacter* sp., uma de *Bacillus* sp. e uma de *Pseudomonas* sp (Touhami *et al.*, 2006). Em outro trabalho, quando sementes de soja foram plantadas em solo contendo fito-patógenos, a posterior inoculação com a linhagem de *B. japonicum* produtora de dois tipos de sideróforo – hidroxamato e catecolato (Khandelwal *et al.*, 2002), promoveu crescimento vegetal e atividade de supressão fito-patogênica. Nesse estudo ainda foram caracterizados, entre as plantas inoculadas, aumentos da porcentagem de clorofila e do conteúdo de óleo, além de maior comprimento das raízes e do número de folhas.

A capacidade de produzir sideróforos é um mecanismo importante para a aquisição de ferro, mas a captação do complexo  $Fe^{3+}$ -sideróforo é essencial para que o sistema seja efetivo. O transporte de  $Fe^{3+}$ -sideróforo para dentro da célula requer energia e depende fundamentalmente de receptores específicos na membrana externa (em bactérias Gram-negativas). Devido à carência de informação a respeito de tal sistema em *B. elkanii*, objetivou-se nesse estudo o isolamento e a caracterização de genes relacionados à expressão de receptores de sideróforos, visando-se um melhor entendimento quanto aos mecanismos utilizados para a aquisição de ferro por essa bactéria.

Dois genes já identificados entre os rizóbios foram escolhidos para análise: *fegA* e *fhuA*. O gene *fegA* codifica um receptor para o sideróforo ferricromo em *B. japonicum* 61A152, que não é produtor de ferricromo, mas de citrato (Guerinot *et al.*, 1990; LeVier & Guerinot, 1996). O receptor de citrato ainda não foi identificado em *B. japonicum*. O gene *fhuA* identificado em *R. leguminosarum*, codifica uma proteína relacionada à captação de vicibactina, sideróforo produzido por essa bactéria (Carson *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1999).

Utilizando-se os *primers fegA* (LeVier & Guerinot, 1996) com os DNAs genômicos de *B. japonicum* SEMIA 5079 e USDA110, uma banda de tamanho esperado foi obtida. Após seqüenciamento, uma seqüência de 308 pb correspondente ao fragmento obtido com o DNA de *B. japonicum* SEMIA 5079, apresentou 96% de identidade com o gene *fegA*. A seqüência de aminoácidos derivada da tradução desse fragmento apresentou identidade de 100% com o gene *fegA*. Entretanto, com o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587, nenhum dos fragmentos obtidos na amplificação com os *primers fegA* correspondeu ao esperado.

Para a amplificação de um fragmento correspondente ao gene *fhuA*, regiões conservadas desse gene foram analisadas em bancos de dados. Devido à proximidade filogenética, optou-se pelo alinhamento simples entre o gene *fhuA* de *R. leguminosarum* com o gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 (predito a codificar uma proteína dependente de TonB), que apresentam 49% de identidade (Tabela 6). A dependência do complexo TonB é característica comum entre todos receptores de sideróforos conhecidos em Gram-negativas.

Utilizando-se os *primers fhuA* projetados obteve-se bandas de tamanho esperado com os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* USDA110. A seqüência de interesse, obtida com o seqüenciamento do fragmento correspondente a *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, apresentou 76% de identidade com o gene *blr4504* de *B. japonicum* USDA110 e 50% com o gene *fhuA* de *R. leguminosarum* (Tabela 6).

Em experimentos de Southern blot utilizando-se os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* USDA110, foi possível observar que a sonda *fegA* não hibridizou com o genoma de *B. elkanii* SEMIA 587 [Figura 16 (a)], o que foi corroborado pelas tentativas sem sucesso de amplificação do gene *fegA* nessa linhagem. Com a sonda *fhuA*, entretanto, o padrão de hibridização obtido revelou a presença desse gene nas três estirpes analisadas. Na comparação entre os genomas, pôde-se observar a presença de uma cópia de *fhuA* para *B. elkanii* SEMIA 587, enquanto que *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* USDA110 possuem uma cópia de cada um dos genes, *fegA* e *fhuA*. Outra constatação observada foi que mesmo possuindo alto índice de identidade com *fhuA*, a sonda *fegA* não hibridizou de forma inespecífica no genoma de *B. elkanii*, indicando que as sondas serviram como bons marcadores para identificação de tais genes nessas linhagens.

Analisando-se as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes *fegA*, *fhuA* e seus correspondentes (Tabelas 6 e 7), observam-se altas taxas de identidade e similaridade, respectivamente. Dados da literatura consideram *fegA* e *fhuA* genes com ancestral comum, ou seja, genes homólogos. Entretanto, o sistema de captação de sideróforo relacionado a *fhuA* ainda depende dos genes *fhuCDB*. O operon *fhuACDB* já foi identificado em vários microrganismos, como, por exemplo, em *E. coli* (onde é bastante conhecido) e *R. leguminosarum*. Por outro lado, *fegA* encontra-se em um operon com o

gene *fegB* em *B. japonicum* 61A152, mas não em USDA110, que não possui genes relacionados nem a *fegB*, nem a *fhuCDB*. Os receptores *fegA* e *fhuA* são bastante similares, mas parecem fazer parte de diferentes sistemas de captação de ferro. (LeVier & Guerinot, 1996; Yeoman, *et al.* 2000; Benson *et al.*, 2005).

Uma análise detalhada do genoma sequenciado de *B. japonicum* USDA110 revelou a existência de mais três putativos receptores de sideróforos, além de *bll4920* (correspondente a *fegA*) e *blr4504* (correspondente a *fhuA*); são eles: *bll7968*, *blr3555* e *blr3904*. Todos os cinco genes são responsivos a ferro e estão entre os genes mais fortemente regulados pela limitação desse metal [Yang *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2008 (*in press*)]. Mutantes para estes cinco genes que codificam receptores de sideróforos foram construídos para a linhagem *B. japonicum* LO, por Small e colaboradores [2008 (*in press*)]. A habilidade em utilizar ferricromo e citrato foi analisada. Todos os mutantes se multiplicaram na presença de citrato, sugerindo que nenhum desses genes é necessário para a captação de tal substrato. Na presença de ferricromo, entretanto, apenas o mutante *bll4920* foi incapaz de se multiplicar. Tal fato é condizente com a alta similaridade (91%) deste gene com *fegA*, que codifica um receptor para ferricromo em *B. japonicum* 61A152. Entretanto, diferentemente de 61A152, as linhagens LO e USDA110, não possuem *fegB* a montante de *bll4920*. Além disso, os mutantes *bll4920*, *blr4504*, *bll7968*, *blr3555* e *blr3904* não apresentam problemas na simbiose com soja, ao contrário do mutante *fegAB* de 61A152. Segundo Small e colaboradores [2008 (*in press*)], tais dados indicam que a linhagem 61A152 pode diferir substancialmente de outras linhagens de *B. japonicum* comumente estudadas.

Quanto à regulação desses cinco genes, a proteína Irr, reguladora da homeostase de ferro, também foi avaliada por Small e colaboradores [2008 (*in press*)]. Irr é o único membro da super-família Fur que parece responder à falta de ferro, e não ao excesso dele como outros reguladores. Irr regula direta e positivamente a maioria dos genes de *B. japonicum* LO e USDA110, incluindo os genes relacionados ao transporte de ferro: na ausência de ferro, Irr ativa a transcrição dos cinco genes que codificam receptores de sideróforos, ligando-se a regiões específicas de seus promotores. A proteína reguladora Fur, bem caracterizada em *E. coli* e *P. aeruginosa*, por exemplo, age de forma inversa, inativando a transcrição na presença de ferro. *B. japonicum* USDA110 também possui um

gene que codifica a proteína Fur, mas segundo Yang e colaboradores (2006), essa proteína tem pouco ou nenhum efeito sobre os genes que codificam transportadores de ferro.

De qualquer forma, a presença de cinco receptores funcionais no genoma de *B. japonicum* USDA110 deve estar relacionada à captação de diferentes tipos de sideróforos exógenos, mesmo que as proteínas acessórias (tal como *fhuCDB*) ainda não tenham sido identificadas nessa estirpe. Entretanto, dados de Khan e colaboradores (2006) não sustentam tal hipótese. A análise de 17 isolados de nódulos de *C. cajan* quanto à capacidade de utilização de 37 sideróforos exógenos foi avaliada naquela pesquisa. Todos isolados apresentaram-se como produtores de sideróforos, mas um deles [GHU(iii)] destacou-se pela ampla capacidade de utilizar sideróforos homólogos (do tipo catecolato, provindos de bactérias de outros nódulos) ou heterólogos (maioria do tipo hidroxamato, provindos de microrganismos da rizosfera). A comparação entre o perfil proteico de membrana externa de GHU(iii) e AP(6)4 (isolado que apresentou os menores índices de utilização-cruzada) sob condições de deficiência de ferro, não apresentou diferença alguma. Em ambos os perfis observou-se a presença de apenas uma proteína de 80 kDa, preferencialmente expressa sob ausência de ferro. A grande habilidade de utilização-cruzada por GHU(iii) não pôde ser atribuída à presença constitutiva de múltiplos receptores, mas talvez ao fato do receptor presente nessa linhagem não ser específico somente para determinados tipos de sideróforos (Khan *et al.*, 2006). Todavia, os autores desse estudo concluíram que a maioria dos isolados dos nódulos de *C. cajan* não deve possuir receptores para sideróforos do tipo hidroxamato, preferencialmente produzidos por bactérias da rizosfera dessa planta, pois poucos foram os isolados capazes de captar hidroxamatos; a maioria foi capaz de utilizar catecolatos, o tipo de sideróforo que essas bactérias mais produzem.

Em *R. leguminosarum*, produtor do sideróforo vicibactina, apenas um receptor foi descrito até o momento: *fhuA*. O operon *fhuACDB* de *R. leguminosarum* possui um pseudogene,  $\psi$ *fhuA*, que se encontra em orientação invertida aos genes *fhuCDB* (Stevens *et al.*, 1999). O gene *fhuA* funcional, que apresenta 32,7% de identidade com  $\psi$ *fhuA*, encontra-se em uma região de DNA (distante do operon *fhuCDB*) próximo ao gene *rpoI*, que codifica o fator ECF $\sigma$ , regulador do operon relacionado à síntese de vicibactina (genes *vbs*) (Yeoman *et al.*, 2000). É relativamente rara a ocorrência de pseudogenes em procariontes, mas nesse caso, o DNA genômico de onze estirpes de *R. leguminosarum* foi

hibridizado com sondas correspondentes a *fhuA* e  $\psi$ *fhuA*: todas apresentaram uma cópia de *fhuA* e quatro apresentaram uma cópia de  $\psi$ *fhuA*.

O fragmento de 434 pb isolado de *B. elkanii* SEMIA 587 nesse trabalho, foi desde o início correlacionado ao gene *fhuA*, uma vez que os *primers* foram projetados de acordo com o gene *fhuA* de *R. leguminosarum* e *blr4504* de *B. japonicum* USDA110. Entretanto, a obtenção desse fragmento, que apresentou 76% de identidade com *blr4504* e 50% com *fhuA*, é apenas o início da busca por um receptor funcional em *B. elkanii*. De acordo com os dados da literatura, é possível perceber a grande diversidade de receptores e sistemas de transporte de ferro, até mesmo entre diferentes estirpes de uma mesma espécie. Dessa forma, apenas com o isolamento das regiões adjacentes ao fragmento chamado de *fhuA* e com a obtenção de um mutante para esse gene, é que tal sistema de captação poderá ser melhor compreendido em *B. elkanii*.

A seqüência derivada da tradução do fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587 mostra a presença de um sítio conservado relacionado à super-família das porinas, além de um sítio relacionado a TonB. Os 145 aminoácidos derivados da tradução desse fragmento apresentam similaridade com a seqüência de diversos receptores dependentes de TonB depositados em bancos de dados, principalmente FhuA, de diferentes microrganismos. A similaridade entre os resíduos de FhuA de *B. elkanii* SEMIA 587 foi de 78, 56, 54 e 49% com *blr4504* de *B. japonicum* USDA110, *fhuA* de *R. leguminosarum*, *fhuA* de *Agrobacterium radiobacter* K84 e *fhuA* de *E. coli*, respectivamente.

Diversas tentativas foram realizadas, além mesmo das descritas nesta Dissertação, a fim de que regiões adjacentes ao fragmento *fhuA* obtido para *B. elkanii* SEMIA 587 fossem identificadas, mas nenhuma delas alcançou o resultado esperado. Entretanto, duas seqüências obtidas pela técnica de *SiteFinding* PCR apresentaram similaridade com proteínas de transporte do tipo ABC (Tabelas 9). A possibilidade de que essas seqüências estejam próximas ao gene *fhuA* de SEMIA 587 ou que suas proteínas tenham alguma relação com o transporte de sideróforos nessa bactéria, poderá ser avaliada por experimentos de hibridização e produção de mutantes. Sobretudo, a busca pelas regiões 5' e 3', vizinhas ao gene *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, não deixará de ser o objetivo principal.

Uma biblioteca parcial de *B. elkanii* SEMIA 587 foi construída. Fragmentos com tamanho aproximado a 4,0 Kb, provenientes da clivagem do genoma com *EcoRI*,

foram clonados no vetor pUC18. A enzima *EcoRI* não apresenta sítio de clivagem para o fragmento *fhuA* de *B. elkanii* SEMIA 587, nem para os genes *fhuA* de *R. leguminosarum* e *blr4504* de *B. japonicum* USDA110. O fragmento de 4,0 Kb muito provavelmente conteria o gene completo (estima-se tamanho aproximado de 2,3 Kb) e as regiões adjacentes. Entretanto, a análise de cerca de 1000 colônias hibridizadas com a sonda correspondente ao fragmento *fhuA*, não forneceu o resultado esperado. Porém, mesmo considerando-se a dificuldade em clonar fragmentos de 4,0 Kb e a grande quantidade de colônias que devam ser analisadas, acredita-se que a construção de uma biblioteca parcial ainda seja uma das alternativas mais viáveis para que o objetivo de isolar as regiões adjacentes a *fhuA* em *B. elkanii* seja alcançado. O isolamento de um fragmento contendo 4,0 Kb tem chances consideráveis de conter informações relevantes sobre um possível operon contendo o gene *fhuA*.

De qualquer forma, para que a funcionalidade desse provável receptor de sideróforos em *B. elkanii* fosse avaliada, construções contendo o fragmento de 434 pb de *fhuA* interrompido por cassete com gene *gfp* e/ou cassete com genes de resistência à estreptomicina e espectinomicina, foram preparadas. A obtenção de um mutante nulo para esse gene permitirá a análise da função de *fhuA*, assim como do tipo de sideróforo que SEMIA 587 capta através desse provável receptor. Com a purificação e caracterização do sideróforo produzido por *B. elkanii* SEMIA 587, através de técnicas de cromatografia e espectrometria de massa (Colaboração da Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato do Instituto de Química da UNICAMP), será possível determinar a relação entre esse sideróforo e o receptor denominado aqui como FhuA. Além disso, a provável utilização desse sideróforo por *B. japonicum*, *R. leguminosarum* e até mesmo outras bactérias que possuam o receptor FhuA, também poderá ser avaliada.

A construção dos mutantes foi realizada com dois cassetes diferentes: *gfp* e *gfp/Sm/Sp*. Considerando-se que o tamanho de 2,8 Kb do cassete *gfp/Sm/Sp* pudesse interferir na recombinação homóloga dupla entre as extremidades do fragmento *fhuA*, com aproximadamente 200 pb cada, e o gene *fhuA* no cromossomo da bactéria, o cassete de apenas 800 pb contendo o gene *gfp* foi uma alternativa utilizada. Além disso, a importância do gene repórter *gfp* é dada pela possibilidade de avaliar a expressão de *fhuA* pelos bacteróides de *B. elkanii* SEMIA 587 dentro do nódulo. Mutantes *fhuA* de *R. leguminosarum*, onde um cassete com o gene *gus* foi utilizado, não apresentaram

problemas relacionados à simbiose com plantas de ervilha (Yeoman *et al.*, 2000). A análise dos nódulos contendo as linhagens mutantes com a fusão *fhuA::gus*, submetidas aos ensaios de atividade enzimática de  $\beta$ -glucuronidase, mostrou-se positiva apenas na zona meristemática do nódulo, onde bactérias não diferenciadas e canais de infecção são encontrados. A zona próxima à raiz, com bacteróides fixando N<sub>2</sub> efetivamente, não apresentou atividade da  $\beta$ -glucuronidase.

As estirpes utilizadas como inoculantes comerciais no Brasil foram isoladas de lavouras de soja do RS. O sucesso da inoculação com as estirpes recomendadas depende, em parte, da sua capacidade de persistir no solo e, assim, competir com a microflora nativa já estabelecida. A competição entre estirpes no solo é complexa e é causada por diferentes fatores, como as características de cada estirpe, o hospedeiro com o qual se relaciona, a interação planta-microrganismo e o impacto do ambiente sobre eles. Alguns experimentos mostraram que as estirpes de rizóbios podem se naturalizar, sofrendo alterações nas características morfológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas, o que as tornam distintas das estirpes introduzidas inicialmente (Boddey & Hungria, 1997; Ferreira & Hungria, 2002). O fato de *B. elkanii* não possuir *fegA*, único receptor para sideróforos caracterizado para o gênero *Bradyrhizobium*, mas possuir um gene similar a *fhuA* de *R. leguminosarum* e produzir sideróforo como essa linhagem, leva-nos a crer na hipótese de que o gene encontrado em *B. elkanii* SEMIA 587 possa ser mesmo *fhuA*. Além disso, a produção de sideróforos por *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 são importantes fatores de características competitivas dessas estirpes.

Para *B. elkanii* SEMIA 587, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que é possível o isolamento de um receptor de sideróforos funcional, assim como a caracterização do tipo de sideróforo produzido por essa bactéria. As etapas seguintes ao processo de transferência das construções contendo o gene *fhuA* interrompido, são necessárias para se comprovar o local exato da integração. Caso essa tenha realmente ocorrido na região desejada, interrompendo o gene *fhuA* em alguma das bactérias selecionadas, o mutante será avaliado quanto à competição em experimentos de nodulação com o tipo selvagem de *B. elkanii* SEMIA 587, à expressão de *gfp* em placas com CAS, à expressão de *gfp* dentro do nódulo, às características das colônias e dos halos em placas com CAS, ao perfil proteico de membrana em relação aos tipos selvagens de *B. elkanii* e *B.*

*japonicum*, ao isolamento da região adjacente à inserção do cassete e à quantificação de mRNA em condições com e sem ferro, por PCR em tempo real (*Real Time PCR*).

## **6 Considerações finais**

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se:

1. Em relação às estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas como inoculantes comerciais no Brasil, *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 são produtoras de sideróforos, enquanto que *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080, assim como a estirpe USDA110 de *B. japonicum*, utilizada nos Estados Unidos, não produzem sideróforos;
2. *B. elkanii* SEMIA 587 apresenta uma cópia do gene *fhuA* em seu genoma e essa cópia tem um alto grau de identidade com seqüências de genes dependentes de TonB, assim como um alto grau de identidade e similaridade com proteínas FhuA de diversas bactérias, relacionadas ou não a essa espécie;
3. *B. elkanii* SEMIA 587, ao contrário de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* USDA110, não possui em seu genoma cópia do gene *fegA*, que codifica um receptor para o sideróforo ferricromo;
4. Dados preliminares indicam que é possível a obtenção de um mutante nulo de *B. elkanii* para o gene *fhuA*.

## 7 Referências Bibliográficas

- Alami Y, Achouak W, Marol C and Heulin T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66:3393–3398.
- Alberton O, Kaschuk G and Hungria M (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* 38:1298–1307.
- Alves BJR, Boddey RM and Urquiaga S (2004) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil* 252:1-9.
- Andrews SC, Robinson AK and Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215–37.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R and Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 204:57–67.
- Barcellos FG, Menna P, Batista JSS and Hungria M (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a brazilian savannah soil. *Appl Environ Microbiol* 73(8):2635–2643.
- Batista JSS, Hungria M, Barcellos FG, Ferreira MC and Mendes IC (2007) Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microb Ecol* 53:270–284.
- Benite AMC, Machado SP and Machado BC (2002) Sideróforos: “uma resposta dos microrganismos”. *Química Nova* 25:1155-1164.
- Benson HP, Boncompagni E and Guerinot ML (2005) An iron uptake operon required for proper nodule development in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 18:950-959.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN and Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235-242.
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet1 C, Denance N, Vasse1 J, Lauber E and Arlat M (2007) Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE* (e224):1-21.
- Boddey LH and Hungria M (1997) Determination of characteristics of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* species in Brazilian strains which nodulate soybean. *Biol Fertil Soils* 25:407–415.
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F and Luna V (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:874–880.
- Boukhalfa H and Crumbliss AL (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325–339.

Braun V, Hantke K and Koster W (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. *Met Ions Biol Syst* 35:67–145.

Braun V and Braun M (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 529:78–85.

Broughton WJ and Perret X (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr Opin Plant Biol* 2:305–311.

Buysens S, Höfte M and Poppe J (1995) Biological control of *Pythium* sp in soil and nutrient film technique systems by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Acta Hortic* 382:238-245.

Carlton TM, Sullivan JT, Stuart GS, Hutt K, Lamont IL and Ronson CW (2007) Ferrichrome utilization in a mesorhizobial population: microevolution of a three-locus system. *Environ Microbiol* 9(12):2923–2932.

Carrilo GC and Vazquez MRG (1992) Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Plant Nutr* 15:579-590.

Carson KC, Dilworth MJ and Glenn AR (1992) Siderophore production and iron transport in *Rhizobium leguminosarum* bv. viande MNF710. *J Plant Nutr* 15:2203-2220.

Carter RA, Worsley PS, Sawers G, Challis GL, Dilworth MJ, Carson KC, Lawrence JA, Wexler M, Johnston AWB and Yeoman KH (2002) The vbs genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*; their expression in other genera requires the ECF c factor RpoI. *Mol Microbiol* 44:1153-1166.

Castro S, Carrera I and Martinez-Drets G (2000) Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *J Microbiol Methods* 41:173-177.

Chimento DP, Kadner RJ and Wiener MC (2003) The *Escherichia coli* outer membrane cobalamin transporter BtuB: structural analysis of calcium and substrate binding, and identification of orthologous transporters by sequence/structure conservation. *J Mol Biol* 332:999–1014.

Chipperfield JR and Ratledge C (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 13:165–168.

Cornelissen C (2003) Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front.Biosci.* 8:836–47.

Crowley DE, Reid CPP and Szaniszlo PJ (1988) Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Phys.* 87:680-685.

De Weger LA, Van Boxtel R, Van der Burg B, Gruters RA, Geels FP, Schippers B and Lugtenberg B (1986) Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J Bacteriol* 165:585–594.

Derylo M and Skorupska A (1992) Rhizobial siderophore as an iron source for clover. *Physiol Plant* 85:549-553.

Dilworth MJ, Carson KC, Giles RGF, Byrne LT and Glenn AR (1998) *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae produces a novel cyclin trihidroxamate siderophore, vicibactin. *Microbiology* 144:781-791.

- Dixon R and Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2:621-631.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22(2):107-149.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U and Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental Microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2:414-424.
- Dwivedi D and Johri BN (2003) Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr Sci* 12:1693-1703.
- Ferguson AD and Deisenhofer J (2002) TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1565:318-332.
- Ferreira MC and Hungria M (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research* 79:139-152.
- Figurski DH and Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1648-1652.
- Fuhrmann J and Wollum AG (1989) Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron. *Biol Fertil Soils* 7:108-112.
- Geurts R and Bisseling T (2002) *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *Plant Cell* 14:S239-S240.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G and Penrose DM (1999) Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, 270 pp.
- Gray EJ and Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37: 395-412.
- Griffin AS, West SA and Buckling A (2004) Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 430:1024-1027.
- Guerinot ML, Meidl EJ and Plessner O (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 14:3298-3303.
- Halbleib CM and Ludden PW (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J Nutri* 30:1081-1084.
- Harrison F, Browning LE, Vos M and Buckling A (2006) Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections *BMC Biology* 4(21):1-5.
- Harvey PJ, Campanella BF, Castro PM, Harm H, Lichtfouse E, Schaffner AR, Smrcek S and Werck-Reichhart D (2002) Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ Sci Pollut Res Int* 9:29-47.

Hogg S (2005) Essential Microbiology. British Library Cataloguing in Publication Data, England, 481 pp.

Jadhav RS and Desai AJ (1992) Isolation and characterization of siderophore from cowpea *Rhizobium* (peanut isolate). *Curr Microbiol* 24:137–141.

Johnston AWB (2000) Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* 146: 829-837.

Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136-139.

Jurkevitch E, Hadarm Y and Chen Y (1992) Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:119-124.

Kechris KJ, Lin JC, Bickel PJ and Glazer AN (2006) Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *PNAS* 103(25) 9584–9589.

Kent AD and Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol* 56:211–236.

Khan A, Geetha R, Akolkar A, Pandya A, Archana G and Desai AJ (2006) Differential cross-utilization of heterologous siderophores by nodule bacteria of *Cajanus cajan* and its possible role in growth under iron-limited conditions. *App Soil Ecol* 34:19–26.

Khandelwal SR, Manwar AV, Chaudhari BL and Chincholkar SB (2002) Siderophoregenic Bradyrhizobia boost yield of soybean. *Appl Biochem Biotechnol* 102:155-68.

Kloepper JW (1993) Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. In: *Soil Microbial Ecology-Applications in Agricultural and Environmental Management*, Ed. F.B. Metting Jr., New York, Marcel Dekker:255-274.

Krewulak KD and Vogel HJ (2007) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* 1778 (2008): 1781–1804

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE and Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501-505.

Leong J (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24:187–209.

LeVier K and Guerinot ML (1996) The *Bradyrhizobium japonicum* *fegA* gene encodes an iron regulated outer membrane protein with similarity to hydroxamate-type siderophore receptors. *J Bacteriol* 23:7265-7275.

Lindsay WL and Schwab AP (1982) The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutr* 5:821–840.

Lodwig E and Poole P (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Crit Rev Plant Sci* 22:37-78.

- Long SR (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8:1855–1898.
- Lynch JM (1990) *The rhizosphere*. Wiley-Interscience, Chichester, England, 458 pp.
- Lynch D, O'Brien J, Welch T, Crosa JH and O'Connell M (2001) Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 183:2576–2585.
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN and Martinez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315–332.
- Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C and Holder IA (1996) Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun* 64(2):518-523.
- Moat AG and Foster JW (1995) Nitrogen metabolism. In: Moat AG e Foster JW (eds) *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, New York:436-461.
- Modi M, Shah KS and Modi VV (1985) Isolation and characterization of catechol-like siderophore from cowpea *Rhizobium* RA-1. *Arch Microbiol* 141:156–158.
- Neilands JB (1981) Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* 50:715-731.
- Neilands JB (1991) A brief history of iron metabolism. *Biol Met* 4:1-6.
- Neilands JB (1993) Siderophores. *Arch Biochem Biophys* 1:1-3.
- Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270:26723-26732.
- Newton WE (2000) Nitrogen fixation in perspective In: Pedrosa FO, Hungria M, Yates MG and Newton WE (eds) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht:3-8.
- Nienaber A, Hennecke H and Fischer HM (2001) Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* 41:787-800.
- Nikaido H (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4):593–656.
- Noya F, Arias A and Fabiano E (1997) Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *J Bacteriol* 179:3076–3078.
- Paulitz TC and Loper JE (1991) Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 81:930–935.
- Peres JRR and Vidor C (1980) Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em estirpes de soja. *Agronomia Sul-Riograndense* 16:205-219.
- Plessner O, Klapatch T and Guerinot ML (1993) Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 59:1688–1690.

- Prentki P and Kirsch HM (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29:303–313.
- Ragland M and Theil EC (1993) Ferritin messenger RNA, protein and iron concentrations during soybean nodule development. *Plant Mol Biol* 21:555-560.
- Ratledge C and Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941.
- Rebah FB, Prévost D, Yezza A and Tyagi RD (2007) Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresour Technol* 98:3535–3546.
- Reiter B, Bürgmann H, Burg K and Sessitsch A (2003) Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can J Microb* 49:549-555.
- Rondon MR, Ballering KS and Thomas MG (2004) Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiology* 150:3857–3866.
- Rosado A, Duarte GF, Seldin L and van Elsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. *Appl Environ Microbiol* 64:2770-2779.
- Roy N, Bhattacharya P and Chakraborty PK (1994) Iron acquisition during growth in an iron deficient medium by *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum*. *Microbiology* 140:2811–2820.
- Roy N and Chakrabartty PK (2000) Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*). *Curr Microbiol* 41:5-10.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- Scher FM and Baker R (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72:1567-1573.
- Schroth MN and Hancock JG (1982) Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 16:1376-1381.
- Schwyn B and Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47-56.
- Selosse MA, Baudoin E and Vandenkoornhuyse P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C R Biol* 327:639–648.
- Small SK, Puri S, Sangwan I and O’Brian MRO (2008) Positive control of ferric siderophore receptor gene expression by the Irr protein in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol In press*.
- Somasegaram P and Hoben JH (1994) *Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York, 450 pp.
- Somers E, Vanderleyden J and Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205-240.

- Sonoda H, Suzuki K and Yoshida K (2002) Gene cluster for ferric iron uptake in *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. In: Rondon MR, Ballering KS and Thomas MG (2004) Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiology* 150:3857–3866.
- Stevens JB, Carter RA, Hussain H, Carson KC, Dilworth MJ and Johnston AWB (1999) The *fhu* genes of *Rhizobium leguminosarum* specifying siderophore uptake proteins: *fhuCDB* are adjacent to a pseudogene version of *fhuA*. *Microbiology* 145:593-601.
- Storey EP, Boghozian R, Little JL, Lowman WD and Chakraborty (2006) Characterization of ‘Schizokinen’; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *BioMetals* 19:637 –649.
- Tas E, Saano A, Leinonen P and Lindstrom K (1995) Identification of *Rhizobium* spp. in peat-based inoculants by DNA hybridization and PCR and its application in inoculant quality control. *Appl Environ Microbiol* 61:1822-1827.
- Touati D (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373:1-6.
- Touhami A, Jericho MH, Boyd JM and Beveridge TJ (2006) Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy. *J Bacteriol* 188(2):370-377.
- Triplett EW and Sadowsky MJ (1992) Genetics of competition for nodulation of legume. *Annu Rev Microbiol* 46:399-428.
- Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453–483.
- Van Loon LC and Bakker PAHM (2003) Signalling in Rhizobacteria–Plant Interactions. *Ecological Studies* 168:297-330.
- Vega NWO (2007) A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 60(1):3621-3643.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J and Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. *Int J Syst Bacteriol* 45:706-711.
- Wandersman C and Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611–47.
- Willems A (2007) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3-14.
- Yang J, Sangwan I and O'Brian MR (2006) The *Bradyrhizobium japonicum* Fur protein is an iron-responsive regulator *in vivo*. *Mol Genet Genomics* 276:555-564.
- Yeoman KH, Wisniewski-Dye F, Timoney C, Stevens JB, Deluca NG, Downie JA and Johnston AWB (2000) Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* 146:829-837.

Yeoman KH, Mittelheiser S, Sawers G and Johnston AWB (2003) The ECF c factor RpoI of *R. leguminosarum* initiates transcription of the *vbsGSO* and *vbsADL* siderophore biosynthetic genes in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 223: 239-244.

Yue W, Grizot S and Buchanan S (2003) Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol Biol* 332:353–68.

Zaied KA, Abd El-Hady HA, Sharief AE, Ashour EH and Nassef MA (2007) Effect of horizontal DNA transfer in *Azospirillum* and *Azotobacter* strains on biological and biochemical traits of non-legume plants. *J Appl Sci Res* 3(1):73-86, 2007.

### **7.1 Fontes da Internet**

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008). <http://www.ibge.gov.br> (Acesso em: 12 jan. 2009)

NCBI - National Center for Biotechnology Information. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

## 8 Apêndice

### 8.1 Meio Levedura Manitol sólido – LM sólido (pH 6,8)

Componentes	Para 1 L de meio
Manitol	10 g
Extrato de levedura	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
NaCl (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
Corante Vermelho Congo (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
Agar	15 g
Água destilada	completar para volume de 1 L

Autoclavagem: 121°C por 15 minutos;

(\*) Descrito no subitem 8.1.2.

### 8.1.1 Meio Levedura Manitol líquido – LM líquido (pH 6,8)

Componentes	Para 1 L de meio
Manitol	10 g
Extrato de levedura	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
NaCl (*)	10 mL (proveniente de sol. estoque)
Água destilada	completar para volume de 1 L

Autoclavagem: 121°C por 15 minutos;

(\*) Descrito no subitem 8.1.2.

### 8.1.2 Soluções-estoque para meio LM

Solução	Componentes	Para 500 mL de solução-estoque
<b>Vermelho Congo</b>	Vermelho Congo	1,25 g
	Água destilada	completar para volume de 500 mL
<b>NaCl</b>	NaCl	5 g
	Água destilada	completar para volume de 500 mL
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 g
	Água destilada	completar para volume de 500 mL
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 g
	Água destilada	completar para volume de 500 mL

## 8.2 Meio Luria Bertani líquido – LB líquido (pH 7)

Componentes	Para 1L de meio
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada	completar para volume de 1 L

Autoclavagem: 121°C por 15 minutos

### 8.2.1 Meio Luria Bertani sólido – LB sólido (pH 7)

Conforme item 8.2, com adição de 15 g de ágar por litro de meio de cultura.

### 8.3 Corante CAS

O corante CAS foi preparado de acordo com o seguinte procedimento: 4,3 g de piperazina anidra foram dissolvidos em 20 mL de água ultra-pura estéril e 6,25 mL de HCl 12M; tal mistura foi reservada. A seguir, misturou-se 1,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mM estéril (diluído em HCl 10 mM) com 7,5 mL de cromoazurol-S 2 mM estéril, e tal solução foi lentamente adicionada e homogeneizada com 6 mL de uma solução 10 mM de CTAB estéril, em um frasco do tipo *erlenmeyer* com capacidade de 100 mL. Por fim, a solução de piperazina anidra foi lentamente adicionada e homogeneizada. O pH foi ajustado para 5,6 e o volume da solução final completado para 100 mL.

## 8.4 Meio King-B/Manitol sólido diluído 5X (pH 6,8)

Componentes	Para 1 L de meio
Peptona	4 g
Manitol	2 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,115 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,150 g
Ágar	15 g
Água destilada	completar para volume de 1 L

Autoclavagem: 121°C por 15 minutos

### 8.5 Soluções para extração de DNA genômico

Solução	Componentes	Quantidade
<b>Lisozima</b>	Lisozima	20 mg
	Tris 10 mM (pH 8)	1 mL
<b>Proteinase K</b>	Glicerol 1M	2,5 mL
	Proteinase K	100 mg
	Tris 50 mM (pH 8)	1 mL
	Água ultra-pura estéril	2,5 mL
<b>SDS 20% (pH 7,2)</b>	dodecil sulfato de sódio	20 g
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL
<b>TE1</b>	Tris 1 M (pH 8)	1 mL
	EDTA 0,5 M (pH 8)	5 mL
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL
<b>TE2</b>	Tris 1 M (pH 8)	1 mL
	EDTA 0,5 M (pH 8)	200 µL
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL

### 8.6 Tampão TBE 5X

Componentes	Para 1 L de meio
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M pH8	20 mL
Água destilada	para completar volume de 1 L

### 8.7 Soluções para Extração de DNA plasmidial

Solução	Componentes	Quantidade
<b>Solução I</b>	Tris 1 M (pH 8)	2,5 mL
	EDTA 0,5 M (pH 8)	2 mL
	Glicose 1M	2,5 mL
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL
<b>Solução II</b>	NaOH 1 N	20 mL
	SDS 20%	5 mL
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL
<b>Solução III</b>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> 5M (pH 5,2)	60 mL
	Ácido acético glacial	11,5 mL
	Água destilada estéril	completar para volume de 100 mL