

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Participação da proteína TtsI e flavonoides na ativação do Sistema de  
Secreção do Tipo III de *Bradyrhizobium elkanii***

**Tese de Doutorado**

**Samanta Bolzan de Campos**

**Porto Alegre**  
**2009**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Participação da proteína TtsI e flavonoides na ativação do Sistema de  
Secreção do Tipo III de *Bradyrhizobium elkanii***

**Samanta Bolzan de Campos**

**Tese 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 Título de  
Doutor em Ciências.**

**Orientadora Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

**Porto Alegre, setembro de 2009**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética desta Universidade e no *Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures* (LBMPS) da Universidade de Genebra. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## *Dedico*

À família Campos, meu pai Irineu, minha mãe Beth, mana Camila e cunhado Ítalo, amo todos vocês, muito obrigado por tudo!

Ao Felipe!

## *Agradecimentos*

- À Dra. Luciane Passaglia pela orientação, paciência, apoio, estímulo, amizade ao longo desses DEZ anos de convivência!!!
- Às professoras do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS: Dra Maria Helena Bodanese-Zanettini e Dra Márcia Margis pela ajuda sempre bem-vinda
- Aos colegas de curso, de laboratório e amigos Adriana Ambrosini, Anelise Beneduzi, Camila Zanella, Clarisse Palma, Gecele Mattos, Milena Homrich, Milena Cardoso, Pedro Costa, Rafael Oliveira, René Soares, Ricardo Weber, Roberto Farina, pelo coleguismo, sugestões e amizade.
- Aos colegas e professores do LBMPS, na Universidade de Genebra: Dr. William J. Broughton, Dr. William J. Deakin, Dra. Silvia Ardissonne, Dra Kumiko Kambara, Dr. Olivier Shumpp, pela orientação; e aos demais colegas e amigos que fiz nesse ano maravilhoso de doutorado sanduíche.
- À técnica e também amiga Silvia Richter pela valiosa ajuda de sempre e pela amizade.
- À Dra Carmem Gottfried e sua aluna Marina Leite, do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela disponibilização do laboratório e equipamentos.
- Ao Dr Emanuel M. de Souza, do Depto de Bioquímica da UFPR, por plasmídeos fornecidos sempre que necessários e a Dra Roseli Wassem, do Depto de Genética da UFPR, por linhagens de *Rhizobium* sp: NGR234 e pela amizade.
- À Eliane Bangel da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO/RS) pelas estirpes de rizobios.
- Ao Elmo e a Ellen pela eficiência e por estarem sempre prontos a nos auxiliar com a parte burocrática.
- Aos meninos do internacionalmente conhecido “Dia do bigode”.
- A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

**MUITO OBRIGADA!**

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	8
<b>Resumo</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	12
<b>1 Introdução</b> .....	13
1.1 Rizóbios .....	13
1.1.1 <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	14
1.2 Nodulação .....	16
1.2.1 <i>Síntese dos fatores Nod</i> .....	17
1.2.2 <i>Fixação Biológica do Nitrogênio</i> .....	19
1.2.3 <i>Regulação da transcrição dos genes relacionados à simbiose</i> .....	23
1.3 Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS).....	25
1.4 T3SS em rizóbios.....	27
1.5 Regulação do T3SS em Rizóbios – proteína TtsI .....	36
<b>2 Justificativa</b> .....	40
<b>3 Objetivos</b> .....	41
<b>4 Material e Métodos</b> .....	42
4.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos .....	42
4.2 Meios de cultura e condições de cultivo .....	43
4.3 Extração de DNA genômico de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	44
4.4 Condições de PCR .....	45
4.5 Amplificação e clonagem de um fragmento do gene <i>ttsI</i> .....	45
4.6 Criação da linhagem mutante <i>B. elkanii</i> 587 $\Omega$ ttsI.....	46
4.7 Southern blot.....	47
4.8 Extração de proteínas secretadas e Western blot.....	48
4.9 Ensaios de nodulação .....	50
4.10 Obtenção e clonagem das regiões promotoras e subclonagem no vetor pPROBE NT .....	51
4.10.1 <i>Amplificação da região promotora do gene ttsI através da técnica de SiteFinding PCR e clonagem em pPROBE NT</i> .....	51

4.10.2	Amplificação e clonagem do nod-box da região promotora dos genes <i>nodABC</i> e subclonagem em <i>pPROBE NT</i> .....	53
4.10.3	Clonagem da região promotora do gene <i>nopC</i> e subclonagem em <i>pBROBE NT</i> .....	53
4.11	Conjugação tri-parental.....	54
4.12	Ensaio de intensidade de GFP.....	55
<b>5.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>56</b>
5.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> 587 possui o gene <i>ttsI</i> .....	56
5.2	Construção da linhagem mutante <i>B. elkanii</i> SEMIA587 $\Delta$ <i>ttsI</i> .....	60
5.3	Identificação do elemento <i>cis tts-box</i> nas regiões promotoras dos genes <i>ttsI</i> e <i>nopC</i> .....	61
5.4	Secreção de proteínas em resposta à indução por flavonoides.....	63
5.5	Ensaio de nodulação .....	64
5.6	Clonagem dos elementos <i>cis (tts-box e nod-box)</i> no vetor <i>pPROBE NT</i> .....	67
5.7	Análise da atividade de Gfp após indução por flavonoides .....	68
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Considerações finais</b> .....	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Referências</b> .....	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Anexo</b> .....	<b>104</b>

## ***Lista de abreviaturas***

ATP	<i>adenosine triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
Ca	cálcio
Da	Daltons
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EPS	<i>exopolysaccharide</i> (exopolissacarídeo)
FBN	fixação biológica de nitrogênio
Fe	ferro
Fe <sup>3+</sup>	íon férrico
FeMo	ferro-molibdênio
G+C	guanina + citosina
IHF	<i>integration host factor</i> (fator de integração do hospedeiro)
kb	quilobase
kDa	quilodaltons
KPS	<i>capsular polysaccharides</i> (polissacarídeo capsular)
LCO	lipoquitooligossacarídeo
LPS	<i>lipopolysaccharides</i> (lipopolissacarídeos)
M	Molar



Mg	magnésio
μg	micrograma
Mg <sup>2+</sup>	íon magnésio
μL	microlitro
μM	micromolar
Mn	manganês
N	nitrogênio
N <sub>2</sub>	nitrogênio atmosférico
ng	nanograma
pb	pares de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
T3SS	<i>Type III Secretion System</i> (Sistema de Secreção do Tipo III)
UAS	<i>upstream activator sequence</i> (sequência ativadora à montante)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

## **Resumo**

*Bradyrhizobium elkanii* é uma bactéria de solo, que fixa nitrogênio e induz a formação de nódulos em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e outras plantas leguminosas. A interação entre as bactérias simbiontes e as plantas no solo ocorre de forma específica e depende de fatores tanto das plantas quanto das bactérias. Entre os fatores mais importantes nessa interação estão os fatores Nod, liberados pelas bactérias em resposta aos flavonoides oriundos das raízes das plantas. Além dos fatores Nod, outros fatores da bactéria respondem à presença de flavonoides, entre os quais estão as proteínas secretadas através do sistema de secreção do tipo III (T3SS-*type III secretion system*). Esse sistema foi primeiramente descoberto em bactérias patogênicas e, até recentemente, se pensava ser exclusivo deste grupo. No entanto, após o sequenciamento do genoma de diversos rizóbios, genes homólogos aos do T3SS de outras bactérias foram encontrados. Dentre os genes do T3SS encontrados nos rizóbios, um, chamado de *ttsI*, apresenta características de regulador da transcrição e está presente nos *clusters* de T3SS de todos os rizóbios estudados. O T3SS foi descrito em *B. elkanii* recentemente. Nesta bactéria esse sistema apresenta as características comuns ao de outros rizóbios. Com o objetivo de estudar o papel da proteína TtsI em *B. elkanii* SEMIA587, uma linhagem mutante para esse gene, com a inserção de um cassete interrompendo a sua sequência, foi obtida. Estudos de secreção de proteínas, testes de nodulação e análise da indução por flavonoides foram realizados nas linhagens selvagem e mutante. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que *B. elkanii* SEMIA587 secreta pelo menos duas Nops (NopA e NopL), após a indução com genisteína, enquanto que a linhagem mutante para o gene *ttsI* é incapaz de secretar estas mesmas Nops, mesmo após a indução com o flavonoide; a região promotora do gene *ttsI* possui um *tts-box*, que é ativo e responde à indução por flavonoides; testes de nodulação com três diferentes plantas leguminosas demonstraram que o T3SS em *B. elkanii* SEMIA587 também possui a

característica de dependência de hospedeiros, como em outros rizóbios estudados, onde a cultivar Peking de soja se mostrou dependente das proteínas secretadas pelo T3SS de *B. elkanii* SEMIA587 para uma nodulação eficiente.

## ***Abstract***

*Bradyrhizobium elkanii* is a soil bacterium that fixes nitrogen and induces nodule formation in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and other leguminous plants. The interaction between the symbiont bacteria and plants in the soil is specific and relies on both plant and bacterial factors. Among the factors that are important for the interaction are the Nod factors, released by the bacterium in response to flavonoid compounds, released by plant roots. Besides Nod factors other bacterial factors respond to flavonoid induction, such as the proteins secreted by the type III secretion system (T3SS). This system was first discovered in pathogenic bacteria, and until recently was thought to be exclusive to those bacteria. However, homologous genes were discovered in some rhizobia after the sequencing of their genome. One of the T3SS genes in the rhizobia, the *ttsI* gene, has transcriptional regulators characteristics and is present in all rhizobia T3SS clusters. *B. elkanii* T3SS was recently described. In this bacterium the system shares common features to other rhizobial T3SS. Aiming to study the role of *B. elkanii* SEMIA587 TtsI protein, a mutant strain of the *ttsI* gene, containing a cassette interrupting the sequence, was obtained. Protein secretion and flavonoid induction analysis, as well as nodulation tests were performed in the wild type and mutant strains. The results obtained showed that *B. elkanii* SEMIA587 secretes at least two Nops (NopA and NopL), after genistein induction, while *ttsI* mutant strain is unable to secrete the same Nops, even after the flavonoid induction; the promoter region of the *ttsI* gene presents a *tts-box*, which is active and responsive to flavonoid induction; nodulation tests performed with three different leguminous plants showed that *B. elkanii* T3SS also displayed host-dependent characteristics, as in other rhizobia, and the Peking soybean cultivar was dependent of *B. elkanii* T3SS efficient system for nodulation.

# ***1 Introdução***

## **1.1 Rizóbios**

Rizóbios são bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae, estritamente aeróbias, quimiorganotróficas, com formato de bastonetes não formadores de esporos, Gram-negativas, de um tamanho que varia de 0,5-0,9  $\mu\text{m}$  x 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ . A sua mobilidade é dada por um flagelo polar único ou dois a seis flagelos peritríqueos (Somasegaram e Hoben, 1994). Normalmente encontradas no solo, fixam nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas e algumas plantas não leguminosas. Essa associação planta-bactéria é de grande interesse, pois oferece benefícios econômicos e ecológicos, uma vez que essas bactérias se associam simbioticamente às plantas e fixam nitrogênio em condições limitantes desse composto (Geurts e Bisseling, 2002).

Embora a nomenclatura e classificação da família Rhizobiaceae sejam ainda muito discutidas (Broughton, 2003), os rizóbios são classificados em seis gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* (Lafay e Burdon, 1998; Michiels *et al.*, 1998; Perret *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002) e *Allorhizobium* (Sessitsch *et al.*, 2002). Esses gêneros fixam nitrogênio atmosférico em nódulos presentes nas raízes de plantas da Família Fabaceae, a qual compreende aproximadamente 750 gêneros, sendo que 250 destes são compostos por plantas cultiváveis (Freire, 1992).

Os rizóbios diferenciam-se de outras bactérias diazotróficas (que fixam nitrogênio) devido à capacidade de nodulação e diferenciam-se entre si pelas características dos seus nódulos. No solo ocorre uma troca de sinalizações moleculares entre a planta hospedeira e a bactéria, na qual compostos flavonoides liberados pela planta nos exudatos das raízes irão induzir nos rizóbios a expressão de operons contendo genes *nod* de forma altamente seletiva (López-García *et al.*, 2002; Ausmees *et al.*, 2004). Os genes *nod* codificam enzimas de biossíntese e liberação de lipo-quitto-oligossacarídeos, conhecidos como fatores

Nod, que são secretados e essenciais para o processo de infecção (Gresshoff, 2003; Ausmees *et al.*, 2004). Após a infecção, sinais bacterianos adicionais, como polissacarídeos de superfície ou proteínas secretadas pelas bactérias, também são requeridos para uma eficiente nodulação de plantas hospedeiras específicas (Ausmees *et al.*, 2004).

Os nódulos fornecem nutrientes e condições ambientais necessárias para que ocorra a fixação de nitrogênio (Mylona *et al.*, 1995; Gresshoff, 2003). Paralelamente à formação do nódulo, as bactérias se ligam às raízes, promovem a formação de estruturas chamadas de brechas de infecção e acondicionam-se no nódulo, onde elas se diferenciam em bacteroides, estrutura bacteriana sem parede celular, que é a forma capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (Mylona *et al.*, 1995).

### **1.1.1. *Bradyrhizobium elkanii***

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são de grande importância econômica devido a sua associação simbiótica com a soja (*Glycine max* L. Merr.). No Brasil, são comercialmente utilizadas como inoculantes dessa leguminosa e suprem a necessidade de adubação nitrogenada das lavouras (Rumjanek *et al.*, 1993).

Dentre as bactérias desse gênero a mais estudada é a espécie *B. japonicum*, que inclusive já teve o seu genoma totalmente sequenciado (Gottfert *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002). Essa espécie é a mais utilizada como inoculante para as lavouras de soja em países como Estados Unidos e Japão (Boiero *et al.*, 2007). O Brasil, que é o segundo produtor mundial dessa leguminosa, utiliza como inoculantes uma mistura de *B. japonicum* e *B. elkanii* (Rumjanek *et al.*, 1993). Entretanto, foi demonstrado que a maior parte das estirpes usadas como inoculantes no Brasil pertencem à espécie *B. elkanii* (Rumjanek *et al.*, 1993).

Ambas as espécies de *Bradyrhizobium* foram introduzidas no Brasil, juntamente

com a soja, nos locais de cultivo da planta, na década de 1960. Após esse período no solo, diferenças em relação às linhagens parentais puderam ser observadas e indícios de transferências gênicas horizontais entre as bactérias que nodulam soja foram relatados (Barcellos *et al.*, 2007).

A separação taxonômica das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* ocorreu somente em 1992, quando diferenças tanto fenotípicas quanto genotípicas foram constatadas (Kuykendall *et al.*, 1992). As bactérias da espécie *B. japonicum* diferem das bactérias *B. elkanii* no espectro de plantas hospedeiras: ambas são simbiontes de leguminosas, porém a primeira é incapaz de induzir a formação de nódulos no genótipo *rj1* de soja e no amendoim, enquanto que a segunda geralmente interage com esses dois tipos de plantas (Devine e Kuykendall, 1996); *B. elkanii* induz a formação de clorose em folhas, devido à produção de rizobiotoxinas, o que não é constatado em *B. japonicum*. Outra diferença marcante entre as duas espécies é a maior resistência a uma série de antibióticos em *B. elkanii* (Rumjanek *et al.*, 1993; Devine e Kuykendall, 1996). Outros trabalhos destacaram outras diferenças entre as duas espécies, dentre as quais, além das já mencionadas, *B. elkanii* apresenta uma maior produção de compostos como ácido indol acético, enquanto que *B. japonicum* apresenta as atividades de hidrogenase e nitrato redutase, entre diversos outros fatores analisados (Devine e Kuykendall 1996).

Justamente a produção de rizobiotoxinas por *B. elkanii* tem sido um dos aspectos mais estudados dessa bactéria. A molécula, cuja estrutura foi resolvida em 1972 como sendo um enol-éter aminoácido, possui função de inibição de ACC sintase na rota de biossíntese de etileno. O composto, que por muito tempo foi tratado como fitotoxina, foi descrito recentemente como tendo um papel positivo na nodulação de *B. elkanii* com as plantas leguminosas hospedeiras (Sugawara *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a produção de rizobiotoxinas impede a ação do etileno, que, quando liberado, inibe a infecção por

rizóbios. Por consequência, a presença de rizobiotoxinas favorece a nodulação em plantas como *Macroptilium atropurpureum* e *Vigna radiata* (Yuhashi *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2006), pois aumenta a eficiência da bactéria nesse processo (Yuhashi *et al.*, 2000).

## 1.2 Nodulação

Após o contato inicial entre a raiz da planta e a bactéria no solo, uma série de sinalizações químicas liberadas por ambas as partes funcionam como atrativos no caso de uma interação compatível, sendo como uma “conversa molecular” no solo. A planta libera, através de suas raízes, flavonoides que são, por sua vez, percebidos pelas bactérias no solo (Perret *et al.*, 2000). Em resposta aos flavonoides a bactéria inicia um processo de ativação da transcrição de genes responsáveis pela confecção dos fatores Nod, que são moléculas sinalizadoras que atuam nas raízes das plantas no estabelecimento da simbiose (Viprey *et al.*, 1998).

As raízes das plantas estão constantemente expostas a uma variedade de microrganismos e a parede celular é uma barreira importante para as infecções não desejadas. Uma troca de sinais recíproca entre a planta hospedeira e o microrganismo simbiote permite que a bactéria penetre nas raízes (Jones *et al.*, 2007).

A maioria das plantas da família das Leguminosas secreta compostos fenólicos, especialmente flavonoides, moduladores dos genes dos rizóbios que são necessários para a interação com a planta hospedeira. Genes importantes para a simbiose são regulados dessa forma e incluem aqueles que direcionam a síntese dos fatores Nod, que, por sua vez, induzem a curvatura das raízes suscetíveis e permitem a entrada dos rizóbios nas brechas de infecção. Uma vez dentro da célula vegetal, outros sinais de ambos os parceiros ajudam a direcionar o cordão de infecção ao córtex da raiz. A comunicação simbiótica deve continuar, uma vez que entre 1 a 99 % dos cordões de infecção podem ser abortadas



(Deakin e Broughton, 2009). Os cordões de infecção ramificam e os rizóbios entram para as células do córtex, por endocitose, e diferenciam-se em bacteroides, forma na qual os rizóbios são capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (Jones *et al.*, 2007). Durante a entrada nas células vegetais e após a diferenciação para bacteroides, os rizóbios continuam separados do citoplasma da planta através das membranas do simbiossomo, que é um compartimento do tipo membrana, derivado do hospedeiro, que se origina da brecha de infecção contendo a bactéria (Relic *et al.*, 1994; D’Haeze *et al.*, 1998; Mergaert *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007).

Os passos iniciais para o processo de infecção, isto é, curvatura dos pelos das raízes, divisão celular cortical e formação do cordão de infecção, são eventos específicos somente encontrados em interações compatíveis entre a planta hospedeira e o rizóbio (Stacey, 1995).

Os genes de nodulação de rizóbios estão organizados em diversos operons, que podem estar localizados no cromossomo ou em grandes plasmídeos, dependendo da espécie (Chen *et al.*, 2005). Em *B. japonicum* os genes de nodulação, assim como os genes de fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*), estão localizados em dois grandes agrupamentos no cromossomo, separados por uma região de aproximadamente 200 kb (Stacey, 1995). Já em *Rhizobium* sp NGR234, os genes envolvidos na simbiose, como os de nodulação e fixação de nitrogênio, estão localizados, em sua maioria, no plasmídeo simbiótico pNGR234a (Freiberg *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2004).

### **1.2.1 Síntese dos fatores Nod**

Em resposta à liberação de moléculas indutoras apropriadas pela planta hospedeira os rizóbios sintetizam e liberam uma família de lipoquitooligosacarídeos (LCOs). que são chamados de fatores Nod (Perret *et al.*, 2000). O primeiro passo na formação dos fatores

Nod se dá a partir do produto do gene *nodC*, que é uma N-acetil-glucosamil-transferase. Essa enzima sintetiza um quitoooligossacarídeo, alongando a cadeia em terminações não redutoras. A desacetilase NodB remove o N-acetil da extremidade dos oligossacarídeos da N-acetilglucosamina, e, finalmente, uma acetiltransferase, codificada por *nodA*, liga a cadeia acil ao acetil livre da extremidade do oligossacarídeo (Mergaert *et al.*, 1997; Perret *et al.*, 2000). As proteínas NodI e NodJ, apesar de não serem essenciais para a formação dos fatores Nod, podem estar envolvidas na exportação destes (Perret *et al.*, 2000).

As proteínas NodABC são suficientes para a indução da formação de nódulos na maioria das plantas leguminosas hospedeiras, uma vez que formam a cadeia principal dos fatores Nod (Broughton e Pueppke, 1999; Perret *et al.*, 2000) conforme está demonstrado na Figura 1. Os outros componentes Nod, no entanto, possuem um papel mais sutil na nodulação, podendo aumentar a abrangência de plantas hospedeiras, ou mesmo agindo na proteção da degradação dos fatores Nod (Perret *et al.*, 2000). Entre os genes, cujos produtos estão envolvidos nesses processos estão: *nodEF*, responsáveis por adicionar ácidos graxos à cadeia principal; *noeC*, responsável pela arabinosilação; *nodZ* e *nolK*, responsáveis pela fucosilação; *nodH* e *noeE*, responsáveis pela sulfatação; *nodL*, *nodX* e *nolL*, responsáveis pela acetilação; *nodS*, *nodU* e *nolO*, responsáveis pela N metilação e carbamoilação; *noeI*, responsável pela 2-O-metilação (Carlson *et al.*, 1993; Mergaert *et al.*, 1997; Broughton e Pueppke, 1999; Perret *et al.*, 2000; Geurts e Bisseling, 2002).

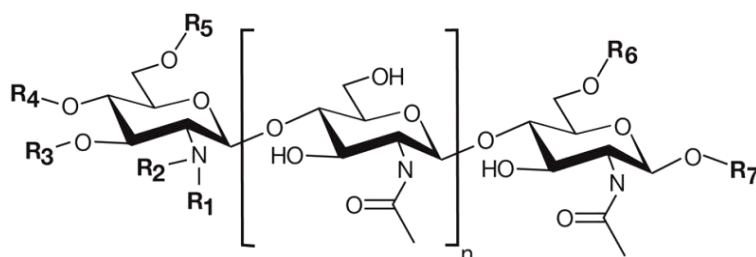


Figura 1: Estrutura da cadeia principal dos Fatores Nod, produzida pelas proteínas NodABC (Retirado de *Essentials of Glycobiology*, 2 edição, CSH Press, 2008)

Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, as bactérias *B. japonicum* e *B. elkanii* possuem estruturas diferentes de fatores Nod (Ruan e Peters, 1992; Stockkermans *et al.*, 1992; Carlson *et al.*, 1993). Em um estudo comparativo, os pesquisadores encontraram que na linhagem USDA61 (atualmente classificada como *B. elkanii*) haviam oito tipos de fatores Nod adicionais aos produzidos por *B. japonicum* USDA110. O interesse em desvendar os tipos de fatores Nod produzidos por essas bactérias se deu devido ao fato de que elas possuem diferentes plantas hospedeiras. No que diz respeito a essas modificações, as estruturas apresentadas por *B. elkanii* se assemelham àquelas apresentadas por *Rhizobium* NGR234, evidenciando que uma gama maior de estruturas nos fatores Nod pode significar um maior espectro de hospedeiros para as bactérias (Carlson *et al.*, 1993).

### **1.2.2 Fixação Biológica do Nitrogênio**

O nitrogênio é uma molécula essencial à vida, fazendo parte de importantes biomoléculas, como aminoácidos e bases nitrogenadas. O nitrogênio proveniente da atmosfera está sob forma de  $N_2$  (com uma ligação tripla entre seus átomos) se tornando muito resistente ao ataque químico e, portanto, indisponível para a maioria dos organismos. Existem, no entanto, microrganismos capazes de converter o  $N_2$  em formas assimiláveis pelos outros organismos, como a amônia. Esses microrganismos são chamados diazotróficos e o processo de redução do nitrogênio é conhecido como Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). A FBN é responsável por mais de 60% do nitrogênio fixado disponível (Halbleib e Ludden, 2000). A relevância desse processo se dá, além da redução dos custos com adubos nitrogenados, pela importância do nitrogênio como um elemento vital, aumentando a produtividade das plantas (Peters *et al.*, 1995).

Os microrganismos diazotróficos realizam a FBN graças ao complexo enzimático

da nitrogenase, cuja reação com o nitrogênio atmosférico resulta em amônia, que, então, é fornecida pela bactéria para a planta a ela associada. O complexo enzimático da nitrogenase é composto de duas subunidades: dinitrogenase redutase (produto do gene *nifH*), também chamada de Fe-proteína, e dinitrogenase (produto dos genes *nifDK*), também chamada de MoFe-proteína (Rangaraj *et al.*, 2001; Dixon e Kahn, 2004). Durante a catálise, a dinitrogenase é reduzida pela dinitrogenase redutase, um elétron por vez, até que uma quantidade suficiente de elétrons (em geral oito) tenha sido acumulada para a subsequente redução do substrato (Dixon e Kahn, 2004). Esse processo utiliza uma grande quantidade de energia: pelo menos 16 moléculas de ATP são necessárias para cada molécula de N<sub>2</sub> reduzida. Devido a isso, existem diversos níveis de controle na expressão dos genes envolvidos e ainda mecanismos de controle em nível posterior à transcrição (Fu *et al.*, 1989; Halbleib e Ludden, 2000; Rangaraj *et al.*, 2001; Dixon e Kahn, 2004).

Os genes envolvidos no processo de FBN são chamados de *nif* (de *nitrogen fixation*) e foram primeiramente caracterizados na bactéria diazotrófica de vida livre *Klebsiella pneumoniae*. A maioria dos genes está envolvida na montagem e estabilização do complexo enzimático da nitrogenase. Existe uma grande similaridade em estrutura, organização e função dos genes *nif* nos diversos organismos estudados em comparação com os genes de *K. pneumoniae*. Nesta bactéria, os genes estão localizados em uma região genômica de 24.000 pares de base, organizados em oito operons (Arnold *et al.*, 1988). Os genes estruturais da nitrogenase estão localizados no mesmo operon (*nifHDK*). Muitos dos outros genes *nif* estão envolvidos na síntese do cofator da enzima, FeMo-co, entre eles *nifE*, *nifN*, *nifV*, *nifB* e *nifQ*. Existem ainda genes envolvidos no transporte de elétrons, como os genes *nifJ* e *nifE* (Dixon, 1984; Arnold *et al.*, 1988).

O grande gasto energético que o processo de FBN demanda faz com que ocorra um controle rígido sobre a transcrição dos genes *nif* (Dixon e Kahn, 2004). Entre os genes *nif*

de *K. pneumoniae nifL* e *nifA* sintetizam proteínas com funções regulatórias. NifL é uma flavoproteína (Dixon, 1998) com a função de reprimir a atividade da proteína NifA, quando as condições para a síntese da nitrogenase não são adequadas, normalmente em resposta à presença de oxigênio e nitrogênio fixado. Já a proteína NifA reconhece e se liga em sequências UAS (sequências ativadoras à montante, do inglês: *upstream activator sequence*) no DNA, aproximadamente 100 nucleotídeos à montante do sítio de ligação da RNA-polimerase, ativando a transcrição dos genes *nif*. As sequências UAS possuem a sequência consenso TGT-N<sub>10</sub>-ACA e estão presentes em regiões promotoras de genes *nif* caracterizados, evidenciando que estes genes estão sujeitos à ativação da transcrição pela ligação da proteína NifA (Dixon, 1984; Arnold *et al.*, 1988; Dixon, 1998).

Além do sistema *nifLA* outros genes, cujos produtos apresentam funções regulatórias gerais, também podem estar envolvidos na regulação dos genes *nif*, como, por exemplo, os genes do sistema *ntr*. As proteínas NtrBC estão envolvidas na regulação do metabolismo de nitratos, regulação posterior à tradução da nitrogenase e podem, também, ativar a transcrição de *nifA* (Arnold *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 1989; Merrick e Edwards, 1995; Huergo *et al.*, 2004). A proteína NtrB é uma quinase/fosfatase que controla a atividade da proteína reguladora NtrC. Em condições limitantes de amônia NtrC é fosforilada por NtrB e ativa a transcrição de genes relacionados à fixação de nitrogênio pela RNA-polimerase complexada ao fator  $\sigma^{54}$ . Em condições desfavoráveis, o grupamento fosfato é retirado da proteína NtrC, interrompendo a transcrição dos genes (Dixon e Kahn, 2004; Huergo *et al.*, 2004).

A proteína PII, produto do gene *glnB*, é necessária para a ativação da transcrição de NifA, que é requerida na transcrição de todos os genes *nif* (Araújo *et al.*, 2004; Dixon e Kahn, 2004). Ela funciona como um sensor do status de nitrogênio da célula. Quando a concentração interna de glutamina for baixa, uma uridil-transferase (GlnD, produto de

gene *glnD*) uridila a proteína PII, alterando a conformação da proteína, permitindo que NtrB fosforile NtrC, sinalizando para a posterior transcrição de genes para a fixação de nitrogênio. Por outro lado, quando existe nitrogênio

intracelular, GlnD retira a modificação de PII, reprimindo, conseqüentemente, a transcrição dos genes *nif* (Huergo *et al.*, 2004; Dixon e Kahn, 2004).

Outro mecanismo de controle ocorre em algumas bactérias através dos produtos dos genes *draT* e *draG*. Essas proteínas possuem funções regulatórias posteriores à tradução da nitrogenase, agindo diretamente sobre a enzima, inativando-a quando o nível de oxigênio celular está muito elevado (Fu *et al.*, 1989; Grunwald *et al.*, 2000).

A região promotora dos genes envolvidos no metabolismo e fixação do nitrogênio possui uma sequência de reconhecimento pela RNA-polimerase que difere daquelas presentes em genes que desempenham outras funções. Essa sequência consenso se caracteriza pelo grande conteúdo de nucleotídeos G e C, localizando-se nas posições -24/-12, e é reconhecida pelo fator sigma alternativo da RNA-polimerase ( $\sigma^{54}$ ), também chamado de  $\sigma^N$  (Dixon, 1998). A RNA-polimerase complexada ao fator  $\sigma^{54}$  necessita da presença de proteínas acessórias para a transcrição de genes, e, no caso dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio, é a proteína NifA, juntamente com a proteína IHF (fator de integração do hospedeiro, do inglês: *integration host factor*) (Dixon, 1998; Barrios *et al.*, 1999). Com a ligação da proteína ativadora NifA na região UAS e o reconhecimento e ligação da RNA-polimerase complexada ao fator  $\sigma^{54}$  na região promotora, a proteína IHF promove uma curvatura no DNA, aproximando essas duas proteínas. A interação da proteína NifA com o complexo da RNA-polimerase-  $\sigma^{54}$  promove o início da transcrição dos genes *nif* (Zhang *et al.*, 1997; Dixon, 1998).

### 1.2.3 Regulação da transcrição dos genes relacionados à simbiose

#### Genes *nod*

Os genes de nodulação de rizóbios estão organizados em diversos operons, que podem estar localizados no cromossomo ou em grandes plasmídeos, dependendo da espécie (Chen *et al.*, 2005). Os genes são positivamente regulados pela proteína NodD (produto do gene *nodD*), que pertence à família de ativadores de transcrição LysR de bactérias. Apesar de variações entre linhagens, a expressão dos genes *nod* é mediada pela proteína NodD através da ligação dessa proteína na região de DNA consenso altamente conservada de aproximadamente 47 pb, chamada de *nod-box*. Os *nod-box* são encontrados nas regiões promotoras de genes envolvidos na nodulação (Swanson *et al.*, 1993; Perret *et al.*, 2000; Loh e Stacey, 2001). A proteína NodD uma vez em contato com o flavonoide específico, liberado pela planta hospedeira, sofre uma mudança conformacional e se liga nos *nod-box*, situados nas regiões promotoras dos genes *nod*, *nol* e *noe* (Stacey, 1995; Viprey *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2006). A expressão dos genes *nod* leva à síntese dos fatores Nod (Perret *et al.*, 2000; Bais *et al.*, 2006).

Duas proteínas NodD foram identificadas em *B. japonicum*, com funções e padrões de expressão distintos: NodD1 funciona como um ativador da transcrição dos genes *nod*, responsivo a flavonoides liberados pelas raízes das plantas (como genisteína e daidzeína); NodD2, ao contrário, funciona como repressor da transcrição desses genes. Um mecanismo similar de ação destas proteínas também ocorre em *Rhizobium* sp.NGR234 (Fellay *et al.*, 1998; Loh e Stacey, 2001; Loh e Stacey, 2003). Entretanto, em *B. japonicum*, NodD1 é auto-regulada e induzível por flavonoides, como genisteína e daidzeína, diferentemente do que ocorre em *Rhizobium* sp. (Loh e Stacey, 2003), cuja expressão é constitutiva.

Apesar de NodD1 ser essencial à expressão dos genes *nod*, mutantes de *B. japonicum*, defectivos na proteína NodD1, ainda são capazes de nodular suas plantas

hospedeiras, porém em uma taxa menor que a bactéria de tipo selvagem (Sanjuan *et al.*, 1994; Loh *et al.*, 1997). Esta aparente contradição foi posteriormente resolvida com a descoberta de componentes regulatórios secundários, NodVW, que também estão envolvidos na ativação de genes *nod* por isoflavonas (Sanjuan *et al.*, 1994). NodVW são importantes na formação de nódulos em plantas hospedeiras alternativas, como por exemplo *Vigna unguiculata*, feijão caupi (*V. radiata*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*) (Gottfert *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1994), porém, não são requeridos para a nodulação de soja (Loh *et al.*, 1997).

A análise da sequência de DNA dos genes *nodVW* indicou que ambos pertencem à família de proteínas reguladoras do tipo dois componentes (*two-component system*). Nessa família, os membros são classificados em duas subclasses: sensores e reguladores. Após a detecção do estímulo ambiental correto, o sensor transduz o sinal para o regulador, que, por sua vez, regula a expressão dos genes alvo. Esse processo é mediado por diversos passos de fosforilação. Ao receber o estímulo, o domínio quinase do sensor autofosforila-se em um resíduo de histidina conservado. A quinase ativada, então, transfere o grupamento fosforil para um resíduo de aspartato no domínio N-terminal da proteína reguladora, ativando-a. No caso das proteínas NodVW, foi sugerido que NodV funcione como o sensor e NodW como o regulador, regulando a transcrição dos genes *nod* em *B. japonicum* (Sanjuan *et al.*, 1994; Loh *et al.*, 1997).

Assim como NodVW, Nola também é essencial para uma nodulação efetiva de uma planta hospedeira por *B. japonicum* (Loh e Stacey, 2001). Nola funciona como um dos dois reguladores negativos da transcrição de genes de nodulação, juntamente com a proteína NodD2 (Loh e Stacey, 2001; Krause *et al.*, 2002). Diferentemente dos genes de nodulação, *nola* não é induzido por isoflavonas (Loh *et al.*, 1999). Foi descrito que a transcrição de *nola* pode ser induzida em resposta a quitooligossacarídeos presentes nas



células. Além disso, os quitoooligosacarídeos podem inibir por *feedback* a expressão dos genes de nodulação que governam a sua própria síntese. Esse mecanismo de *feedback* ocorre com a participação de NodA e NodD2 (Loh e Stacey, 2001). Um resumo da rede de regulação em *B. japonicum* USDA110 está ilustrado na Figura 2.

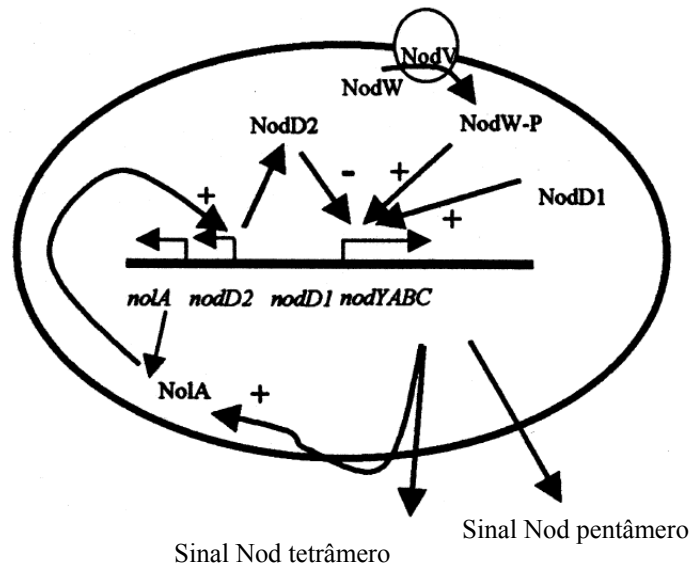


Figura 2: Modelo para a regulação dos genes envolvidos na nodulação em *B. japonicum* USDA110 (Reproduzido de Loh e Stacey, 2001).

### 1.3 Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS)

Muitas bactérias patogênicas de plantas e animais usam o Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS, de *type 3 secretion system*) como arma na infecção da célula eucariótica hospedeira (Hueck, 1998; Ghosh, 2004; Mudgett, 2005). O T3SS permite que bactérias Gram-negativas injetem proteínas de virulência diretamente no citosol das células eucarióticas hospedeiras. O sistema é altamente conservado entre as mais diversas bactérias patogênicas, e, no entanto, as proteínas por ele secretadas são completamente

diferentes, demonstrando a grande capacidade de adaptação das bactérias patogênicas (Hueck, 1998).

As proteínas injetadas na célula eucariótica podem interagir com fatores eucarióticos com função de transdução de sinal, de modo a se tornarem capazes de interferir com a sinalização celular. Essa mudança pode acarretar em desarmamento da resposta imune das células hospedeiras, deixando o caminho livre para a infecção (Hueck, 1998).

O T3SS já foi identificado em diversos microrganismos patogênicos de animais como: *Yersinia* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella* spp, *Chlamydia* spp. Também foi identificado em fitopatógenos, como: *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Erwinia* spp e *Xanthomonas* spp. Porém, a distribuição do T3SS não é exclusiva de patógenos, e o sistema já foi encontrado em bactérias endosimbiontes (Ghosh, 2004).

O aparato do T3SS é composto por cerca de 20 proteínas diferentes, das quais pelo menos dez são altamente conservadas entre as mais diversas bactérias já estudadas. Dentro das proteínas conservadas existe ainda uma grande semelhança de sequência com proteínas do corpo basal do flagelo bacteriano (Hueck, 1998; Ghosh, 2004). Devido a essa semelhança questões levantando a origem evolutiva desses dois aparatos já foram discutidas em alguns trabalhos (Gophna *et al.*, 2003). Análises filogenéticas demonstraram que os sistemas formam ramos diferentes de árvores filogenéticas, quando comparados com quaisquer de seus componentes homólogos, e, ainda, que T3SS foi repetidamente transferido horizontalmente entre as bactérias durante a história evolutiva, enquanto que o aparato flagelar não (Saier, 2004). Tanto o flagelo, quanto o T3SS, tem secreção de proteínas como meio de funcionamento: o flagelo funciona como um motor rotatório impulsionado por potenciais iônicos, a sua montagem requer a secreção da subunidade

flagelar em um processo realizado pela ATPase flagelar. A secreção de proteínas pelo T3SS também depende de uma ATPase e de potenciais iônicos transmembrana (Ghosh, 2004).

O T3SS é essencial em bactérias fitopatogênicas para a indução de uma reação de defesa chamada de resposta hipersensível (HR - *hypersensitive response*) em plantas resistentes que, normalmente, não são hospedeiras de um patógeno em particular (Hueck, 1998; Buttner e Bonas, 2006). A HR é caracterizada por necrose localizada de tecidos e a produção de compostos fenólicos e agentes antimicrobianos no local de contato com a bactéria. Os genes das bactérias que são responsáveis pela patogenicidade em plantas suscetíveis e por HR em plantas resistentes foram definidos como *hrp* (do inglês: *hypersensitive response and pathogenicity*), e esta nomenclatura se manteve para os genes de patogenicidade via T3SS (Hueck, 1998).

Em contraste com o que ocorre em patógenos de animais, o T3SS de fitopatógenos possui um grande número de proteínas efetoras por ele secretadas, como, por exemplo, em *Yersinia* são conhecidos seis efetores, enquanto que em *P. syringae* são 29, que, presumivelmente, interferem de maneira coletiva no hospedeiro, interferindo na sinalização celular, beneficiando o patógeno (Buttner e Bonas, 2006).

Os efetores T3SS de fitopatógenos contribuem para a patogênese através de processos celulares que levam à resistência a doenças. Foi demonstrado que, em adição às funções de virulência, os efetores T3SS possuem um papel de suprimir diretamente as defesas das células vegetais, agindo no interior da célula hospedeira (Mudgett, 2005).

#### **1.4 T3SS em rizóbios**

Dentre os genes envolvidos com a nodulação já descritos para as espécies de rizóbios existem alguns envolvidos na faixa de amplitude de hospedeiros para a simbiose.

Esse é o caso dos genes *nolXWBTUV* em *Sinorhizobium fredii* USDA257, os quais, quando mutados, alteraram a especificidade de hospedeiros da bactéria. Tal bactéria mutante foi capaz de nodular uma cultivar de soja anteriormente não suscetível à infecção por essa bactéria (Krishnan *et al.*, 1995; Krishnan, 2002; Ausmees *et al.*, 2004). A transcrição dos genes *nolXWBTUV* é dependente da presença de flavonoides e das proteínas reguladoras de transcrição NodD1 e NodD2 (Krishnan *et al.*, 1995). Análises moleculares e o sequenciamento da região do locus *nolXWBTUV* (que pode ser referido como locus de especificidade de cultivar) de *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997; Viprey *et al.*, 1998) e *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Gottfert *et al.*, 2001) revelaram a presença de um sistema de secreção do tipo III. Em *Rhizobium* sp. NGR234 foi constatado que esse sistema se apresentava completo e simbioticamente ativo (Viprey *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2001; Bartsev *et al.*, 2003; Ausmees *et al.*, 2004).

Em bactérias Gram-negativas fitopatogênicas, o T3SS é requerido para a colonização do tecido vegetal hospedeiro, através da secreção e translocação de proteínas efetoras para a célula vegetal (Lahaye e Bonas, 2001; Mudgett, 2005). A presença do sistema, porém, também foi verificada em bactérias comensais (como *Photorhabdus luminescens*, *Sodalis glossinidius* e *Sitophilus zeamais*), assim como em rizóbios simbioses de plantas e alguns outros procariontes não-patogênicos (Tampakaki *et al.*, 2004). Foi sugerido que a função desse sistema em organismos simbioses seria similar àquela que ocorre em patógenos, ou seja, a secreção de proteínas efetoras diretamente dentro da célula hospedeira eucariótica (Krishnan, 2002; Krishnan *et al.*, 2007).

O T3SS é induzido através do contato com as células hospedeiras (Tampakaki *et al.*, 2004). Em *Rhizobium* sp. NGR234, e também em estirpes de *S. fredii* (Krishnan, 2002), demonstrou-se que a secreção de proteínas ocorre de forma dependente de NodD1 (a proteína ativadora da transcrição dos genes de nodulação) e do T3SS (Viprey *et al.*,

1998; Perret *et al.*, 2000). Foi visto, também, que o T3SS de *Rhizobium* sp. NGR234 afeta profundamente a nodulação de vários legumes, como *Tephrosia vogelii*, com esta bactéria (Viprey *et al.*, 1998), sugerindo-se que o sistema atue na especificidade dos hospedeiros em bactérias simbiotes (Perret *et al.*, 2000). Outra função para o sistema em simbiotes seria a superação de defesas não específicas das plantas, as quais são ativadas na presença de microrganismos invasores, de modo que as proteínas secretadas seriam percebidas pelas plantas, levando a um aumento da nodulação (Perret *et al.*, 2000, Bartsev *et al.*, 2003; Marie *et al.*, 2003; Ausmees *et al.*, 2004; Bartsev *et al.*, 2004; Marie *et al.*, 2004; Deakin *et al.*, 2005).

Os genes do sistema de secreção do tipo III em rizóbios foram inicialmente descobertos através do sequenciamento do locus simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234, onde, dentre os 416 genes presentes nessa região, dez tiveram sequências possivelmente relacionadas com componentes estruturais desse sistema (Freiberg *et al.*, 1997; Viprey *et al.*, 1998). Estes genes estão localizados adjacentes ao locus que contém os genes essenciais para a fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) (Viprey *et al.*, 1998). Em rizóbios, a nomenclatura desses genes foi novamente alterada e eles são chamados de *rhc* (do inglês, *rhizobia conserved*; Viprey *et al.*, 1998).

Baseado na estrutura do aparato do T3SS de *P. syringae* foram sugeridas as funções dos componentes desse sistema em rizóbios: RhcC1 e RhcC2 correspondem aos domínios N e C-terminal de HrcC, que é uma proteína de membrana externa. RhcJ é uma lipoproteína de membrana externa. RhcR, RhcS, RhcT, RhcU e RhcV são proteínas de membrana interna. Duas proteínas citoplasmáticas RhcN e RhcQ também compõem o sistema, que está ilustrado na Figura 3 (Viprey *et al.*, 1998; Krishnan *et al.*, 2003).

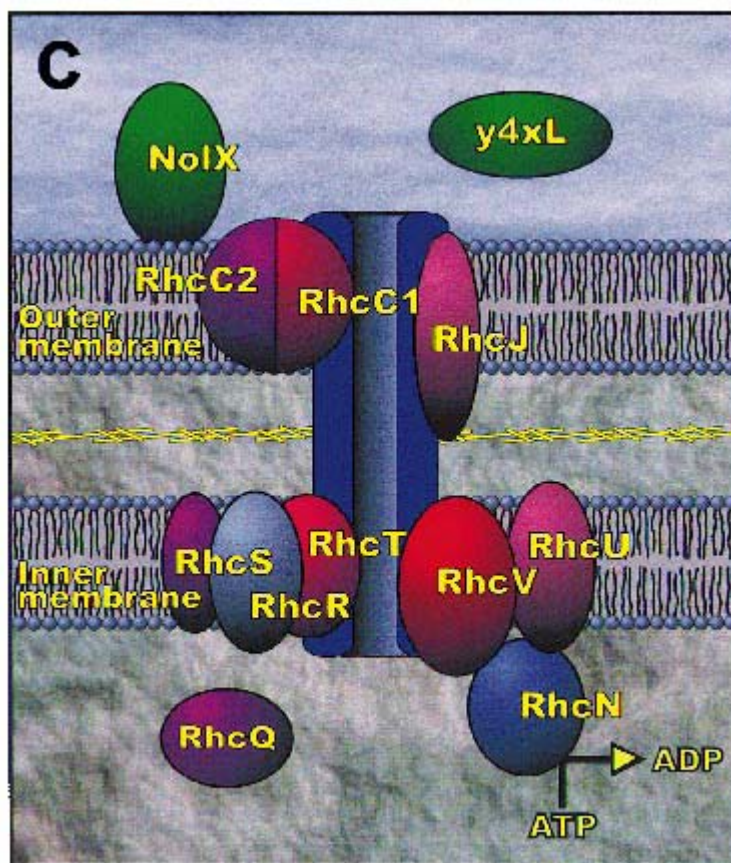


Figura 3: Modelo de estrutura e organização do complexo do Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) em *Rhizobium sp.* NGR234. Reproduzido de Viprey *et al.*, 1998.

Marie e colaboradores (2001) introduziram o termo Nop (do inglês, *nodulation outer proteins*) para proteínas transportadas e secretadas pelo T3SS de rizóbios. Em *Rhizobium sp.* NGR234 genes que codificam proteínas secretadas foram identificados: *nopA*, *nopB*, *nopC*, *nopJ*, *nopL*, *nopM*, *nopP*, *nopT* e *nopX* (Viprey *et al.*, 1998; Bartsev *et al.*, 2003; Marie *et al.*, 2003; Ausmees *et al.*, 2004; Bartsev *et al.*, 2004; Deakin *et al.*, 2005; Saad *et al.*, 2005; Skorpil *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008; Kambara *et al.*, 2009). Trabalhos realizados por diversos autores (Krishnan, 2002; Krishnan *et al.*, 2003; Lorio *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2007; López-Baena *et al.*, 2008) demonstraram que esse sistema em *S. fredii* é altamente similar ao encontrado em *Rhizobium sp.* NGR234, com várias proteínas Nops sendo secretadas. Em *B. japonicum*,

genes similares à *nopA*, *nopB*, *nopL* e *nopP* estão localizados no agrupamento *tts* (Krause *et al.*, 2002). O gene *nopX*, no entanto, não está presente no genoma dessa bactéria (Süß *et al.*, 2006).

O papel das Nops na nodulação das mais diversas leguminosas começou a ser desvendado em 2003, quando um trabalho utilizou mutantes em diversos genes *nop* para definir quais as consequências dessas mutações para a nodulação. Utilizando *Rhizobium* NGR234, que é capaz de nodular pelo menos 232 plantas leguminosas, como modelo, foi determinado que certas Nops são essenciais para a nodulação de algumas plantas (*Tephrosia vogelii*, *Flemingia congesta*), ao passo que podem ser prejudiciais para outras plantas (*Pachyrhizus tuberosus*, *Crotalaria juncae*) (Marie *et al.*, 2003). Esse trabalho ainda infere sobre as prováveis funções de duas Nops: NopX seria uma proteína que compõe o *translocon*, envolvida na translocação de outras proteínas, enquanto que NopL agiria como a proteína efetora propriamente dita, atuando diretamente sobre o citoplasma da célula vegetal hospedeira. Em um estudo posterior foi determinado que NopL pode ser fosforilada no interior da planta, por quinases vegetais (Bartsev *et al.*, 2003), o que levou os autores a sugerir que a função dessa proteína na interação planta-bactéria seria a de interferir na cascata de transdução de sinais, responsável pela indução dos genes de defesa das plantas, uma vez que esses genes se mostraram suprimidos em plantas transgênicas expressando NopL (Bartsev *et al.*, 2004).

NopP foi descrita através do estudo da mutantes em *Rhizobium* NGR234 (Ausmees *et al.*, 2004). Nesse trabalho concluiu-se que essa também se trata de uma proteína efetora, de forma similar à que ocorre com NopL. NopP também atua na célula vegetal, em interação com as proteínas vegetais, sendo alvo de fosforilação por quinases vegetais (Ausmees *et al.*, 2004; Skorpil *et al.*, 2005). Esta proteína se mostrou como a determinante no estabelecimento de simbiose com os legumes tropicais *Flemingia congesta* e *Tephrosia*

*vogelii*, e, ainda, foi sugerido que esta proteína funcione juntamente com a NopL, uma vez que duplos mutantes para os dois genes correspondentes (*nopP* e *nopL*) apresentam fenótipos negativos em testes de nodulação (Skorpil *et al.*, 2005).

NopA foi mais profundamente estudada em 2005 (Deakin e colaboradores), quando os autores descreveram o papel do pequeno peptídeo NopA como sendo um componente externo da maquinaria. Semelhanças com HrpA, que em fitopatógenos é formador de pilus do T3SS, sugerem que a proteína NopA esteja envolvida na formação de uma forma de pilus, para a translocação de proteínas efetoras. *Rhizobium* NGR234 sintetiza apêndices extracelulares de forma dependente de flavonoides e do T3SS, dos quais NopA é um dos principais componentes. Essa foi a primeira vez que foi demonstrada que a secreção de outras Nops é dependente de NopA, evidenciando a função de formadora de estrutura parecida com pilus. Nesse artigo é descrita, ainda, a descoberta de uma nova Nop, que foi nomeada NopC (Deakin *et al.*, 2005).

NopB também apresentou características de apêndices extracelulares relacionados a uma estrutura parecida com pilus. No trabalho de Saad e colaboradores (2005) foi demonstrada a presença e função da proteína NopB em *Rhizobium* NGR234 e, ainda, foi discutida a presença de sequências homólogas a do gene *nopB* em outros rizóbios, demonstrando que a proteína NopB deve estar presente nessas bactérias.

NopJ, NopM (Kambara *et al.*, 2008) e NopT (Dai *et al.*, 2008; Kambara *et al.*, 2008) foram recentemente descritas em *Rhizobium* NGR234. NopJ possui grande homologia com a proteína YopJ de patógenos que contém o T3SS, cuja função é a interação com proteínas de transdução de sinais da célula eucariótica hospedeira. NopM pertence a um grupo de proteínas efetoras que é caracterizado por conter múltiplas repetições ricas em leucina, domínios esses que estão envolvidos nas interações proteína-proteína (Kambara *et al.*, 2008). NopT apresenta homologia com YopT, um efector de



patógenos que pertence à família de cisteíno-proteases (Dai *et al.*, 2008; Kambara *et al.*, 2008). Em outro estudo foi verificada a existência de um homólogo à NopT em *B. japonicum* USDA110, porém não em outros rizóbios, sugerindo que este seja um efetor específico de algumas linhagens. Dai e colaboradores (2008) sugerem a evolução desse efetor de fitopatógenos. Um resumo das prováveis funções e estrutura das Nops está representado na Figura 4.

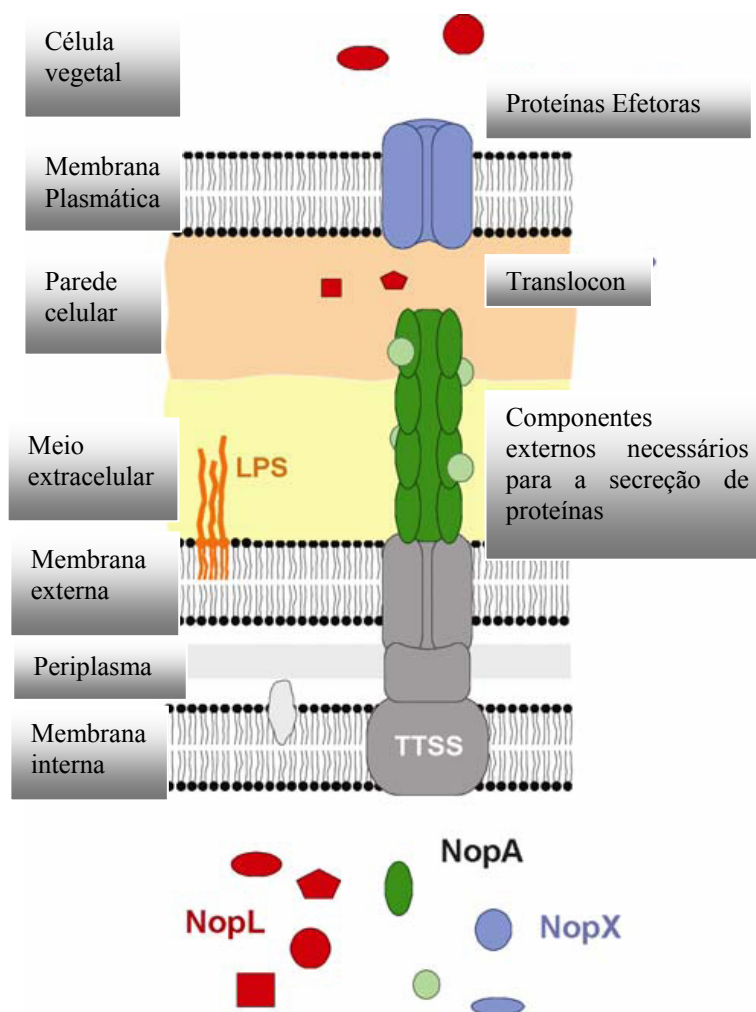


Figura 4: Papel das diferentes Nops em *Rhizobium* sp. NGR234. Algumas das proteínas têm papel na formação de um pilus que transporta as demais proteínas para o meio extracelular (NopA), algumas proteínas fazem parte de um complexo chamado de *translocon* que possui função de transporte de proteínas (NopX); enquanto outras proteínas agem diretamente como efetoras, podendo ser fosforiladas por quinases das plantas (NopL). (Adaptado de Marie *et al.*, 2003.)

Em outros rizóbios, diversos componentes do T3SS foram igualmente caracterizados. Em um trabalho realizado com outro microssimbionte de soja, *Sinorhizobium fredii* USDA257, foi demonstrado que outros fatores, além dos flavonoides, podem influenciar na secreção de proteínas. No caso, a presença do íon cálcio afeta consideravelmente a secreção de diversas Nops, diminuindo a sua secreção, podendo levar a consequências agrônomicas em solos calcários (Krishnan *et al.*, 2007). Foi visto, também, que um mutante da linhagem HH103 de *S. fredii*, para um dos genes conservados (*rhcJ*) é incapaz de secretar Nops após a indução por flavonoides (de Lyra *et al.*, 2006).

Outro estudo realizado com essa mesma bactéria (*S. fredii*) mostrou diferenças entre duas linhagens (*S. fredii* USDA257 e *S. fredii* USDA191) para genes componentes do sistema (Lorio *et al.*, 2006). O gene *y4xP* presente no *cluster* do T3SS apresenta duas cópias na linhagem USDA257, enquanto que a linhagem USDA191 possui apenas uma cópia. Além disso, as linhagens apresentam quantidades diferentes de Nops secretadas, acarretando em diferentes capacidades simbióticas em interação com soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. A proteína NopB foi identificada em *S. fredii* USDA257 e sua função de proteína associada ao pilus foi descrita (Lorio *et al.*, 2004). Utilizando técnicas de proteômica foram identificadas nessa bactéria NopM e NopD (Rodrigues *et al.*, 2007).

O T3SS foi descoberto em *B. japonicum* USDA110 através do sequenciamento da região simbiótica, uma região de aproximadamente 410 kb (Gottfert *et al.*, 2001). Nessa bactéria foram encontrados diversos genes homólogos aos genes *rhc* de *Rhizobium* NGR234 e alguns genes candidatos a serem secretados pelo T3SS. Porém, a organização do *cluster* se mostrou diferente da encontrada nos outros rizóbios e algumas proteínas secretadas, como por exemplo, NopX, não estão presentes no genoma dessa bactéria (Krause *et al.*, 2002; Süß *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado com *B. japonicum* USDA110 para identificar os genes ativados após a indução pelo flavonoide genisteína foram identificadas diversos candidatos a serem secretados via T3SS (Süß *et al.*, 2006). Nesse trabalho, oito proteínas candidatas foram descritas, dentre as quais foram encontradas algumas homólogas às Nops de *Rhizobium* NGR234, como, por exemplo, NopP, e, também, genes relacionados ao flagelo. GunA2, que foi descrita como uma endoglucanase, também foi demonstrada ser secretada via T3SS nesse trabalho. O genoma de *B. japonicum* USDA110 também foi analisado quanto à resposta à indução por genisteína, onde diversos genes, incluindo os do T3SS, se mostraram mais ativos após algumas horas de indução (Lang *et al.*, 2008).

Recentemente, foi descrita a organização genômica e a sequência completa do *cluster* do T3SS de *B. elkanii* USDA61 (Okazaki *et al.*, 2009). Foi sequenciada uma região de 47,1 kb, que mostrou a presença dos genes de T3SS, além de nove sequências reguladoras *tts-box*, e um *nod-box*, esse último localizado na região promotora do gene *ttsI*. Esse trabalho demonstrou os rearranjos genômicos e, ainda, as diferenças entre o sistema em comparação com *B. japonicum* USDA110. Os autores construíram duas linhagens mutantes para os genes *rhcC2* e *rhcJ*. Estudos utilizando a técnica de gel de proteína em duas dimensões identificaram NopA, NopB, NopL, NopX e NopP. Comparado com outros rizóbios, uma característica única do T3SS de *B. elkanii* USDA61 é que, sob condições normais de multiplicação (mesmas condições utilizadas em *B. japonicum* USDA110), as proteínas são secretadas de forma independente de um indutor conhecido. Esse resultado indica que a regulação do T3SS em *B. elkanii* USDA61 é, de alguma forma, diferente dos outros rizóbios, apesar da semelhança existente na sequência da proteína reguladora TtsI. Os autores identificaram também, em testes de nodulação, que o sistema nessa bactéria possui um fenótipo dependente de hospedeiro. Em plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) as bactérias mutantes apresentaram um número menor de nódulos, porém,

eles foram maiores que os induzidos pela bactéria de tipo selvagem. Em plantas *Vigna radiata* a resposta foi diferente, conforme a cultivar testada, da mesma forma que ocorreu nos testes com soja (*G. max*).

Um resumo de todos os processos que ocorrem na interação das plantas com as bactérias após a percepção do flavonoide na rizosfera, subsequente ativação do T3SS e dos genes de nodulação está representado na Figura 5.

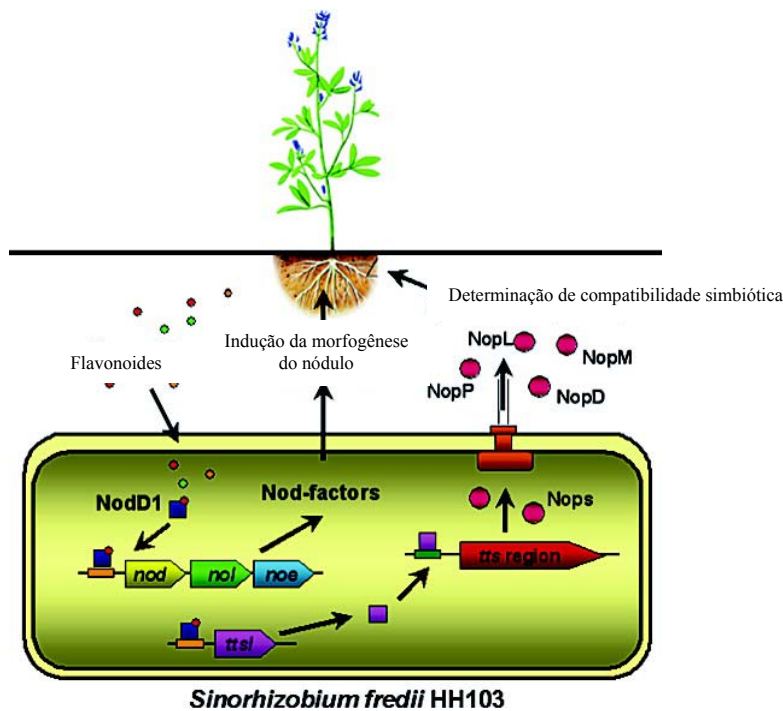


Figura 5: Resumo dos passos para a formação do nódulo e ativação do T3SS, após a indução por flavonoides, em *Sinorhizobium fredii* HH103. Reproduzido de Rodrigues e colaboradores (2007). Em laranja estão representados os *nod*-box e em verde estão representados os *tts*-box.

### 1.5 Regulação do T3SS em Rizóbios – proteína TtsI

Os flavonoides ativam a transcrição dos genes do T3SS em rizóbios através da ativação de NodD1. Na região promotora do gene *ttsI* dos diversos rizóbios já caracterizados foi encontrado o motivo *nod*-box, sequência a qual a proteína NodD1 se liga para a ativação da transcrição dos genes por ela regulados (Krause *et al.*, 2002; Krishnan *et*

*al.*, 2003; Marie *et al.*, 2004; López-Baena *et al.*, 2008). O gene *ttsI* é o único que possui características de ativador de transcrição entre todos os genes do locus do T3SS, sugerindo que essa proteína seja o único regulador da transcrição dos demais genes desse sistema (Wassem *et al.*, 2008).

Krause e colaboradores identificaram, em 2002, sequências consenso na região promotora dos genes do T3SS, as quais são reconhecidas pela proteína TtsI, em *B. japonicum*. Essas regiões foram nomeadas *tts-box* (Krause *et al.*, 2002) e foram identificadas também em *Rhizobium* NGR234 (Marie *et al.*, 2004; Wassem *et al.*, 2008) e em *S. fredii* (López-Baena *et al.*, 2008).

A análise da sequência da proteína TtsI revelou similaridade com ativadores de transcrição do tipo de dois componentes. O estudo detalhado da região promotora de alguns genes do T3SS em *Rhizobium* NGR234, *M. loti* e *S. fredii* revelou a presença nestas de um motivo conservado na sequência que foi, então, nomeado *tts-box*. Esse motivo foi testado em estudos de expressão sob indução de genisteína e se mostrou ativo e induzível para esse flavonoide em *B. japonicum* USDA110 (Krause *et al.*, 2002). Interessantemente, o fenótipo de um mutante para esse gene de *B. japonicum* USDA110 em testes de nodulação não se mostrou tão severo quanto mutantes em genes estruturais do sistema. Além disso, o fenótipo encontrado em associação com a soja foi o de um atraso na nodulação (Krause *et al.*, 2002).

Normalmente, os reguladores de transcrição do tipo dois componentes são ativos pelos parceiros com função de sensores (histidino-quinases) através da auto-fosforilação do resíduo de histidina após o estímulo ambiental. O grupamento fosforil é posteriormente transferido a um resíduo de aspartato no parceiro regulador, induzindo a uma mudança conformacional que leva à ativação. Uma vez ativa, essa proteína se liga a elementos *cis* na região promotora dos genes requeridos pelo sinal ambiental, ativando a transcrição

(Wassem *et al.*, 2008). A proteína TtsI de rizóbios, no entanto, possui um resíduo de glutamato no lugar do resíduo aspartato conservado e necessário para a ativação pelo parceiro sensor dos dois componentes. Em outras bactérias que possuem essa proteína, esse tipo de mudança na sua sequência de aminoácidos leva a uma ativação constitutiva da proteína, sem a necessidade da proteína sensora. Portanto, é possível que TtsI em rizóbios funcione como um ativador da transcrição independente de fosforilação e de proteínas sensoras. Ao invés disso, a proteína é ativa em resposta à NodD1 e flavonoides indutores (Kobayashi *et al.*, 2004; Marie *et al.*, 2004; Wassem *et al.*, 2008).

Buscas na sequência completa do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* NGR234, pNGR234a, foram realizadas à procura do motivo conservado *tts-box*. Seis destas sequências foram encontradas em regiões diversas do plasmídeo, fora do *cluster* do T3SS (Marie *et al.*, 2004). Três *tts-box* estavam localizados na região promotora de genes que codificam possíveis proteínas secretadas. Outro elemento foi encontrado na região promotora de genes envolvidos na divisão de plasmídeos. Os outros dois *tts-box* foram encontrados em regiões promotoras de genes envolvidos na síntese de ramnose (Marie *et al.*, 2004). Através do estudo de um mutante com um cassete inserido na sequência do gene *ttsI* os autores demonstraram que a inativação do gene provoca mudanças na característica da camada de LPS da bactéria, que não é capaz de sintetizar o composto ramnose dessa. Esse mesmo mutante foi utilizado para estudos de nodulação e essa bactéria mostrou resultados diferentes aos apresentados com o mutante do gene *rhcN*, cujo fenótipo foi mais severo.

Estudos de expressão gênica em *B. japonicum* USDA110, utilizando o gene repórter *lacZ* fusionado a genes que contém o *tts-box* em suas regiões promotoras revelaram que estes estão ativos em nódulos de quatro semanas de *Macroptilium atropurpureum*, sugerindo que o T3SS é ativo em nódulos fixadores de nitrogênio (Zehner

*et al.*, 2008). Este trabalho também reiterou que o *tts-box* é um elemento promotor essencial ao T3SS.

Em *S. fredii* HH103 o gene *ttsI* foi mais profundamente estudado em um trabalho de 2008 (López-Baena e colaboradores) onde foi demonstrada a presença do *nod-box* em sua região promotora, além de demonstrada a ativação por flavonoides em um estudo utilizando o gene repórter *lacZ*. Os testes de nodulação realizados com uma linhagem mutante para este gene mostraram fenótipos similares aos encontrados em *B. japonicum* USDA110, os quais se mostraram mais severos quando um gene estrutural do sistema foi interrompido. No caso de *S. fredii* HH103, esse gene foi o *rhcJ* (de Lyra *et al.*, 2006; López-Baena *et al.*, 2008). A linhagem mutante para o gene *ttsI* também foi incapaz de liberar proteínas Nops em testes de secreção de proteínas (López-Baena *et al.*, 2008).

Após o estudo de uma mutação deletéria do gene *ttsI* de *Rhizobium* NGR234 concluiu-se que a proteína TtsI é um fator importante na ativação da transcrição de genes que codificam proteínas secretadas (Nops) e que o *tts-box*, presente nas regiões promotoras desses genes, é ativo e responsivo a flavonoides. Desta forma, os autores sugeriram que a regulação do T3SS em *Rhizobium* sp. NGR234 difere daquela vista em bactérias fitopatogênicas (Wassem *et al.*, 2008).

## 2 *Justificativa*

O T3SS em rizóbios foi descrito para a especificidade da simbiose com diversas plantas leguminosas. Dentre as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, poucos trabalhos visando a caracterização do sistema foram realizados até o momento, e, em sua maioria, na espécie *B. japonicum* USDA110. Muitos autores já ressaltaram as diferenças entre as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* em diversos aspectos, entre eles a organização genômica e várias características fenotípicas. Portanto, seria importante caracterizar o sistema em *B. elkanii*. Um artigo publicado em 2009, pelo mesmo grupo de pesquisa responsável pelas publicações com o T3SS de *B. japonicum* (Okazaki *et al.*, 2009), desvendou a sequência do *cluster* desses genes em *B. elkanii* USDA61, e, ainda, alguns aspectos desse sistema nessa bactéria. No entanto, uma caracterização da regulação dos genes e atividade da proteína TtsI ainda não foi desvendada para essa bactéria e muitas questões ainda estão em aberto.

Ambas as espécies são utilizadas comercialmente como inoculantes na cultura de soja no Brasil. Porém, a literatura já demonstrou que a espécie predominante no solo brasileiro é *B. elkanii*. A bactéria aplicada no solo dessa maneira é capaz de fornecer o nitrogênio para a planta, diminuindo a necessidade de adubos nitrogenados.

Levando em consideração a importância da soja para a agricultura e economia do Brasil, e, mais ainda, a grande relevância da nodulação e fixação de nitrogênio para essa cultura, o melhor entendimento dessa interação se faz necessário.



### 3 *Objetivos*

O objetivo desse trabalho foi colaborar com a elucidação do papel da proteína TtsI no T3SS em *B. elkanii* SEMIA587. Mais especificamente:

- Clonar e isolar a sequência de nucleotídeos o gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587;
- Identificar e isolar sequências promotoras de genes do T3SS que contenham o motivo de ligação para a proteína TtsI (*tts-box*);
- Construir uma linhagem mutante de *B. elkanii* SEMIA587 através da inserção de um cassete  $\Omega$  com resistência à estreptomicina e espectinomicina, na sequência do gene *ttsI*;
- Estudar na linhagem mutante (587 $\Omega$ ttsI) e na linhagem selvagem (587) a secreção de proteínas em resposta à indução por flavonoides;
- Estudar na linhagem mutante (587 $\Omega$ ttsI) e na linhagem selvagem (587) a interação com plantas leguminosas, através de testes de nodulação;
- Estudar na linhagem mutante (587 $\Omega$ ttsI) e na linhagem selvagem (587) a regulação e expressão dos genes do T3SS, através de fusões entre o gene-repórter *gfp* e regiões promotoras contendo os *tts-box*, após indução por flavonoides.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados na realização deste trabalho estão relacionados nas tabelas a seguir:

Tabela 1: Linhagens bacterianas

Linhagens bacterianas	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
XL1- <i>blue</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sup>-</sup> K <sup>-</sup> mK <sup>-</sup> ) <i>supE44 relA1 λ<sup>-</sup> lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proABlacI</i> <sup>R</sup> ZDM15 Tn10 (Tc <sup>R</sup> )]	Stratagene
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sup>-</sup> K <sup>-</sup> mK <sup>-</sup> )	Life Technologies
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
SEMIA587	Fixador de nitrogênio em simbiose com soja, utilizada como inoculante comercial no Brasil (Tc <sup>R</sup> )	Fepagro/RS
<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i>	SEMIA587 contendo o cassete Ω interrompendo o gene <i>ttsI</i> (Tc <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 pNT	SEMIA587 carregando o vetor pPROBE NT (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 pNT pTtsI	SEMIA587 carregando o vetor pPROBE NT contendo a região promotora do gene <i>ttsI</i> (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 pNT pNod	SEMIA587 carregando o vetor pPROBE NT contendo a região promotora dos genes <i>nodABC</i> (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 pNT pNopC	SEMIA587 carregando o vetor pPROBE NT contendo a região promotora do gene <i>nopC</i> (Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> pNT	<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> carregando o vetor pPROBE NT (Tc <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> pNT pTtsI	<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> carregando o vetor pPROBE NT contendo a região promotora do gene <i>ttsI</i> (Tc <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho
<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> pNT pNod	<i>B. elkanii</i> 587 Ω <i>ttsI</i> carregando o vetor pPROBE NT contendo a região promotora dos genes <i>nodABC</i> (Tc <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> )	Este trabalho

Tabela 2: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características	Referência
pGEM T-Easy	Ap <sup>R</sup> ; <i>lacZ'</i> ; T7p; SP6p; origem de replicação do fago F1	Promega®
pBluescriptII	KS <sup>+</sup> Fago fl, <i>lacZ</i> , Ap <sup>R</sup>	Stratagene®
pHP45Ω	Pen <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> ; fragmento Omega	Prentki e Kirsch (1984)
pK18mobsacB	Km <sup>R</sup> , Suc <sup>R</sup> ; <i>lacZ'</i> ; vetor mobilizável não-replicativo de <i>E. coli</i>	Schäfer e colaboradores (1994)
pRK2013	Km <sup>R</sup> ; Mob <sup>I</sup> ; Tra <sup>I</sup> ; Col-E1 replicon; plasmídeo <i>helper</i>	Figurski e Helinski (1979)
pPROBE NT	pVS1/p15a vector, Km <sup>R</sup>	Miller e colaboradores (2000)
pGEMttsI	pGEM T-Easy contendo o fragmento do gene <i>ttsI</i> clonado	Este trabalho
pK18ttsI	pK18mobsacB contendo o fragmento do gene <i>ttsI</i> retirado de pGEMttsI e inserido no sítio de EcoRI	Este trabalho
pK18ttsIΩ	pK18ttsI contendo o cassete Ω do vetor pHP45Ω, excisado com <i>SmaI</i> , inserido no sítio de MluI, preenchido, do fragmento do gene <i>ttsI</i> .	Este trabalho
pGEMpTtsI	pGEM T-Easy contendo o fragmento com a região promotora do gene <i>ttsI</i> e parte da região codificadora.	Este trabalho
pGEMNB	pGEM T-Easy contendo a região promotora dos genes <i>nodABC</i> .	Este trabalho
pGEMpNopC	pGEM T-Easy contendo o fragmento da região promotora do gene <i>nopC</i>	Este trabalho
pNTpTtsI	pPROBE NT contendo o fragmento da região promotora do gene <i>ttsI</i>	Este trabalho
pNTNod	pPROBE NT contendo o fragmento da região promotora dos genes <i>nodABC</i>	Este trabalho
pNTpNopC	pPROBE NT contendo o fragmento da região promotora do gene <i>nopC</i>	Este trabalho

#### 4.2 Meios de cultura e condições de cultivo

Os meios de cultura utilizados para as linhagens de *B. elkani* SEMIA587 e derivadas foram YEM (extrato de levedura e manitol), TY (triptona e extrato de levedura) e RMS (meio mínimo para rizóbios contendo succinato como fonte de carbono na

concentração final de 12 mM), todos conforme Somasegaram e Hoben (1994). As bactérias foram incubadas à 28°C por cinco a sete dias. Para as linhagens de *Escherichia coli* foi utilizado o meio Luria Bertani (LB, Sambrook e Russel, 2001), com incubação à 37°C por 24 horas. Quando necessário, os meios de cultura sólidos ou líquidos foram suplementados com concentrações adequadas de antibióticos: para *B. elkanii*, tetraciclina - Tc (10 µg mL<sup>-1</sup>), canamicina – Km (40 µg mL<sup>-1</sup>), espectinomicina - Sp (100 µg mL<sup>-1</sup>) e rifampicina - Rf (75 µg mL<sup>-1</sup>) (Benson *et al.*, 2005); para *E. coli*, ampicilina – Ap (100 µg mL<sup>-1</sup>), canamicina (30 µg mL<sup>-1</sup>), estreptomicina - Sm (20 µg mL<sup>-1</sup>) e espectinomicina (75 µg mL<sup>-1</sup>) (Sambrook e Russel, 2001). Quando indicado, as culturas foram induzidas com os flavonoides genisteína, apigenina ou daidzeína na concentração final de 10<sup>-6</sup> M.

#### **4.3 Extração de DNA genômico de *Bradyrhizobium elkanii***

O DNA genômico das culturas de bradirrizóbios foi extraído segundo o procedimento descrito a seguir. As células bacterianas foram multiplicadas em meio YEM líquido e incubadas à 28°C sob agitação constante de 128 rpm. Alíquotas de 1,5 mL foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga, por 3 minutos à 12.000 rpm. 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. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de solução tampão TE1 (1 % de Tris pH 8 1 M adicionado 5% mL de EDTA 0,5 M) e 25 µL de lisozima [20 mg mL<sup>-1</sup>], com incubação a 37°C por 30 minutos. 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. A seguir, adicionou-se 600 µL de acetato de amônio 8M e as amostras foram mantidas por 30 minutos no gelo, sendo posteriormente centrifugadas por 20 minutos à 12.000 rpm. O

sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi extraído pela adição de igual volume de fenol/clorofórmio. Após centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm, a fase aquosa subsequente foi transferida para um novo tubo. O procedimento foi repetido utilizando-se, ao invés de fenol/clorofórmio, uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 24:1). À fase aquosa, coletada e transferida para um novo tubo estéril, foram adicionados 100 mM de cloreto de sódio e 0,6 volumes de isopropanol. 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%, e suspenso em 50 µL de solução TE (tampão Tris/EDTA).

#### **4.4 Condições de PCR**

O DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587 foi utilizado 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 ( $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ), 2,5 µL de *PCR Buffer* 10 X, 1 µL de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 5 µL de solução de dNTPs 1 mM (1 mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 µMol. Tais amplificações (como todas as demais descritas nessa metodologia) foram realizadas no termociclador *PCR Express Temperature Cycling System* (*Thermo Hybaid*). A amplificação foi realizada da seguinte maneira: uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de: 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

#### **4.5 Amplificação e clonagem de um fragmento do gene *ttsI***

*Primers*, desenhados a partir do alinhamento de sequências obtidas no GenBank

(NCBI) de genes *ttsI* de outros rizóbios, foram utilizados para a amplificação de um fragmento de 364 pares de base. Este fragmento foi clonado no vetor pGEM T-Easy e sequenciado com os *primers* M13 direto e reverso (Sambrook e Russel, 2001), gerando o vetor pGEMttsI. A sequência dos *primers* para a amplificação foi:

ttsI FOR: 5' TCTGCCCGATGGAGACGGCTT 3'

ttsI REV: 5' TGCGCAGGCGATAGATCCCGA 3'

#### 4.6 Construção da linhagem mutante *B. elkanii*587 $\Omega$ ttsI

O vetor pGEMttsI foi digerido com a enzima de restrição EcoRI para a liberação do inserto. Essa reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, e o fragmento correspondente ao inserto foi purificado com o *kit Wizard® SV Gel and PCR purification kit* (Promega®). O vetor conjugativo pK18mobsacB (cedido pelo Prof Dr William J. Broughton – LBMPs, Universidade de Genebra) foi igualmente digerido com a enzima de restrição EcoRI, e uma reação de ligação, contendo uma proporção de 3:1 de fragmento em relação ao vetor, foi realizada utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas®), conforme indicação do fabricante. A ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que foram selecionadas em placas de Petri contendo meio LB suplementado com canamicina. As colônias resultantes foram utilizadas para extração de plasmídeos por mini-preparação, utilizando o *kit S.N.A.P.<sup>TM</sup> Miniprep kit* (Invitrogen). A clonagem foi checada através de digestão com EcoRI. O vetor resultante foi nomeado pK18ttsI.

O cassete, que confere resistência aos antibióticos espectinomicina (Sp) e estreptomicina (Sm), utilizado para a mutação, foi obtido do vetor pHP45 $\Omega$ . O vetor foi digerido com PstI e NdeI por duas horas, e, após inativação das enzimas, foi novamente digerido com SmaI. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e o fragmento de 2 kb, correspondente ao cassete, foi purificado do gel com o *kit Wizard® SV*

*Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®).

O vetor pK18ttsI foi digerido com MluI para a linearização, teve as suas extremidades preenchidas com o fragmento de *Klenow* da DNA polimerase I de *E. coli* (GE Healthcare®). A ele foi ligado o fragmento do cassete purificado, utilizando a T4 DNA Ligase (Fermentas®), conforme indicação do fabricante. Essa ligação foi utilizada para transformar as células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Após seleção com antibióticos apropriados, as colônias resultantes foram inoculadas em meio líquido e tiveram seus plasmídeos extraídos com o *kit S.N.A.P.<sup>TM</sup> Miniprep kit* (Invitrogen). A clonagem foi novamente confirmada por digestão e por PCR, utilizando os mesmos *primers* anteriormente descritos para o gene *ttsI*. O vetor resultante foi nomeado pK18ttsI $\Omega$ .

A seguir, foi realizada uma conjugação tri-parental, utilizando as seguintes linhagens: *E. coli* DH5 $\alpha$  pRK2013 (plasmídeo *helper*); *E. coli* DH5 $\alpha$  pK18ttsI $\Omega$ ; e *B. elkanii* SEMIA587. As linhagens foram misturadas em meio YEM, sem antibióticos e incubadas à 28°C durante 72 horas. Após esse período, as bactérias foram plaqueadas em YEM, suplementado com Tc e Sp, e mantidas à 28°C até o crescimento satisfatório das colônias (entre cinco e sete dias). Uma série de repicagens foi realizada e os transconjugantes candidatos foram testados por PCR e Southern *blots*.

#### **4.7 Southern blot**

Para a confirmação da linhagem mutante foi realizado o experimento de hibridização por Southern *blot*. O DNA das colônias transconjugantes candidatas e da bactéria de tipo selvagem *B. elkanii* SEMIA587 foi extraído como descrito anteriormente. A sonda utilizada foi o fragmento do gene *ttsI* de 364 pb de *B. elkanii* SEMIA587 amplificado. Cinco  $\mu$ g de DNA foram digeridos com HindIII (que não digere a sonda); outra reação foi preparada com a enzima Sall (que digere a sonda). As reações de digestão

foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a corrida, o gel foi fotografado com uma régua e transferido para uma membrana de náilon (GE Healthcare®). O DNA foi fixado na membrana através da exposição à luz ultravioleta por 2 minutos. A membrana foi, então, submetida à hibridização, utilizando o sistema DIG (Roche ®), que também foi utilizado na preparação da sonda, conforme especificações do fabricante.

#### **4.8 Extração de proteínas secretadas e Western blot**

Um pré-inóculo de 5 ml foi realizado em meio YEM, 28°C, com antibióticos para duas linhagens de *B. elkanii*: 587 e 587ΩttsI. Após a multiplicação, as bactérias foram inoculadas em meio RMS sem antibióticos (10 ml). Esses inóculos foram multiplicados à 28°C por 40 horas. Um ml dessa cultura foi utilizado para inocular 100 ml de RMS contendo os tratamentos com flavonoides e controles. Nesse experimento os tratamentos foram: etanol (composto que solubilizou os flavonoides e serve como controle negativo) e genisteína (isoflavona de soja) na concentração final de 10<sup>-6</sup> M. O inóculo foi mantido sob agitação (160 rpm) por um período de 72 horas.

A extração de proteínas foi realizada da seguinte maneira: o conteúdo dos inóculos foi centrifugado por 15 minutos à 10°C (4.000 g). Com o sobrenadante da centrifugação em um novo tubo foi repetido o procedimento. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo um bastão magnético. Os tubos foram mantidos a 4°C e colocados sobre o agitador magnético. Trinta e seis gramas de sulfato de amônio foram adicionadas aos poucos e a mistura foi agitada por uma hora. Após esse período a agitação foi cessada e os tubos foram mantidos por 2 horas a 4°C e, a seguir, centrifugados por 30 minutos (10.000 g) a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi suspenso em 2,5 ml de Tris.HCl pH 8,0 (10 mM) e deixado por 16 horas a 4°C. No outro dia da extração foi retirado o sal com o uso de colunas Nap25 (Amersham



Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. O tampão utilizado foi o mesmo usado na suspensão (Tris.HCl pH 8,0 10 mM) e o volume final foi dividido em 3 tubos do tipo *ependorf*, com um furo na tampa, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e centrifugados a vácuo por 6 horas. Após esse período, as proteínas foram suspendidas em 50 µl de água destilada e foram mantidas em freezer -20°C.

Dois géis de poliacrilamida do tipo SDS- PAGE 12% foram realizados, nos quais foi aplicada a mesma quantidade de proteína (50 µg) e o marcador de peso molecular de proteínas *Protein Ladder* (Invitrogen). Os géis foram corridos por 3 horas a 120 V. Um dos géis foi corado com nitrato de prata e o outro gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para o experimento de *Western blot*.

Para o gel ser corado com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) o seguinte protocolo foi utilizado: após a corrida, o gel foi mantido por 1 hora em solução de metanol (50%) e ácido acético (12%), depois, foi lavado três vezes (15 minutos cada) em etanol (50%). Depois das lavagens, o gel foi transferido para uma solução de tiosulfato de sódio 0,02% (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) por 1 minuto e lavado três vezes com água destilada. Após essas lavagens o gel foi mantido por 20 minutos em solução de nitrato de prata 0,2%. O gel foi novamente lavado três vezes com água destilada e uma solução de revelação (contendo carbonato de sódio-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) foi utilizada até o aparecimento das bandas de proteínas. O gel foi fixado com ácido acético.

O segundo gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose (GE Healthcare®), conforme especificações do fabricante. A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado (5%) diluído em PBS-T (Tampão fosfato salino - Tween 20 0,1%), por 20 minutos e lavada duas vezes (15 minutos cada) em PBS-T. O anticorpo primário foi adicionado ( $\alpha$ -NopA ou  $\alpha$ -NopL, cedidos pelo Dr William Broughton e Dr William Deakin-Universidade de Genebra) em diluição 1:5000 em PBS-T, e incubado por 1 hora.

Após a incubação, a membrana foi lavada (duas vezes, 15 minutos cada) em PBS-T e o anticorpo secundário foi adicionado ( $\alpha$ -coelho) diluído 1:10000 em PBS-T. A membrana foi lavada novamente por quatro vezes (15 minutos) e os agentes de detecção (*kit ECL Western blot*- GE Healthcare®) foram adicionados à membrana e incubados por 1 minuto. A membrana foi exposta a filmes de autorradiografia por 30 segundos a 10 minutos.

#### **4.9 Ensaios de nodulação**

As linhagens de *Bradyrhizobium* foram testadas quanto as suas capacidades de indução da formação de nódulos em ensaios de nodulação com diferentes plantas leguminosas. Nesse trabalho foram realizados testes com as plantas *Vigna unguiculata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Glycine max* (L.) Merrill (Cv Peking e McCall), todas obtidas da coleção do *Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures* (LBMPS, cedidas pelo Dr William Broughton-Universidade de Genebra), conforme Pueppke e Broughton (1999).

As sementes das plantas foram desinfestadas com ácido sulfúrico concentrado (cinco minutos), lavadas com água destilada esterilizada (quatro vezes) e etanol 70% (dois minutos), mais uma série de lavagens com água destilada estéril (três vezes) e germinadas em placas contendo ágar e água (1%) por dois a cinco dias (dependendo da planta testada) à 28°C. As plântulas (com aproximadamente dois cm) foram transferidas para potes do tipo Magenta e transferidas para câmaras de crescimento por dois a três dias. Após esse período, a tampa do pote foi retirada e as bactérias foram inoculadas diretamente nas raízes das plantas, que foram mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura diurna de 26-28°C e noturna de 18°C.

O inóculo das bactérias (*B. elkanii* 587 e *B. elkanii* 587 $\Delta$ ttsI) foi preparado após multiplicação em meio YEM por cinco dias com antibióticos apropriados à 28°C com

agitação (160 rpm). No dia do inóculo, as bactérias foram lavadas duas vezes em MgSO<sub>4</sub> 10 mM e foram inoculadas diretamente nas raízes das plantas: 100 µl de bactérias com concentração de 10<sup>8</sup> células por ml.

Os nódulos rosados (contendo bactérias que fixam nitrogênio) foram contados após períodos fixos de 14 e 28 dias. Os dados do experimento de nodulação representam repetições de no mínimo três plantas por tratamento e a análise estatística utilizada foi o teste *t* de Student, com valores  $P \leq 0,05$  considerados significantes.

#### **4.10 Obtenção e clonagem das regiões promotoras e subclonagem no vetor pPROBE NT**

##### ***4.10.1 Amplificação da região promotora do gene *ttsI* através da técnica de SiteFinding PCR e clonagem em pPROBE NT***

Uma adaptação do método descrito por Tan e colaboradores (2005) foi realizada. A técnica pode ser resumida em três etapas: Reação de *SiteFinding*, reação primária do *Nested* PCR e reação secundária do *Nested* PCR. *Primers* gene específicos anelam-se nas sequências conhecidas e *primers SiteFinding* (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 *SiteFinder* (5' CACGACACGCTACTCAACACACCACCTCGCACAGCGTCCTCAAGCGGCCCGCN NNNNNGCGC 3') em baixa temperatura, uma fita é sintetizada pela *Taq* DNA polimerase, gerando moléculas alvo em fita dupla de diferentes tamanhos; na reação primária do *Nested* PCR, o DNA alvo é amplificado exponencialmente com SFP1 (5' CACGACACGCTACTCAACAC 3') e um *primer* gene-específico, 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, novamente o DNA alvo é amplificado exponencialmente por um *primer* alvo gene-específico mais interno combinado com o *primer* SFP2 (5' ACTCAACACACCACCTCGCACAGC 3'), 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.

O *primer* ttsIREV foi utilizado nas duas etapas de amplificação, como *primer* gene-específico. O produto de amplificação após as duas etapas, apresentou tamanho de aproximadamente 700 pb. Esse produto foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega®) e sequenciado, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13 direto e reverso (Sambrook e Russel, 2001). Esse plasmídeo foi nomeado pGEMpTtsI.

Após o sequenciamento, um novo *primer* foi desenhado e foi utilizado para amplificação da região promotora:

pTtsI sense: 5' ACTCAACACACCACCTCGCA 3'

Uma PCR foi realizada utilizando esse *primer* em conjunto com o ttsIREV. O produto de amplificação de aproximadamente 700 pb foi purificado e preenchido com o fragmento de *Klenow* da DNA polimerase I de *E. coli* (GE Healthcare®). O vetor pPROBE NT, que possui o gene repórter *gfp* sem promotor fusionado ao sítio de clonagem (Miller *et al.*, 2000) foi digerido com a enzima de restrição SmaI. O fragmento purificado e o vetor digerido foram utilizados em uma reação de ligação, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas®). A ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias resultantes tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos e foram checadas por PCR, utilizando o *primer* pTtsI sense com um oligonucleotídeo desenhado para amplificação da GFP (GFPanti) (5' AAGCTTCCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA 3'). O plasmídeo que apresentou banda de amplificação de tamanho esperado foi nomeado pNTpTtsI.

#### **4.10.2 Amplificação e clonagem do nod-box da região promotora dos genes nodABC e subclonagem em pPROBE NT**

Utilizando a sequência de *B. elkanii* USDA94 disponível no GenBank (U04609) foi possível o desenho de *primers* específicos para a região promotora dos genes *nodABC* de *B. elkanii*, contendo o motivo *nod-box*. Os *primers* foram:

nodFOR: 5' GGGCTGGCTCAGGTTAATTT 3'

nodREV: 5' GCCATCGTGGCATAACCTAAT 3'

Esses oligonucleotídeos foram utilizados em PCRs com o DNA genômico de *B.elkanii* SEMIA587 como molde e o produto de amplificação de tamanho esperado (222 pb) obtido foi clonado no vetor pGEM-T Easy, gerando o plasmídeo pGEMNB.

Uma reação de digestão com a enzima EcoRI foi realizada para o plasmídeo pGEMNB e para o vetor pPROBE NT. A reação do pGEMNB foi submetida à eletroforese em gel de agarose e o inserto de 222 pb foi purificado do gel. O fragmento purificado foi ligado ao pPROBE NT clivado com EcoRI utilizando T4 DNA Ligase, e a reação de ligação foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias resultantes foram checadas através de reações de amplificação, utilizando os *primer* GFP *anti* e nodFOR. O plasmídeo que apresentou uma banda de amplificação de tamanho esperado foi nomeado pNTNB.

#### **4.10.3 Clonagem da região promotora do gene nopC e subclonagem em pBROBE NT**

Uma região genômica que compreende a sequência promotora do gene *nopC*, que possui um putativo *tts-box*, de aproximadamente 4 kb, foi amplificada utilizando *primers* desenhados a partir da sequência de *B. elkanii* USDA61 disponível no GenBank

(FM162234).

pNopCFOR: 5' TTGACGGTCGAGAGTTCTGT 3'

pNopCREV: 5' CAGGACTTTTCCAGCTTTCA 3'

Esse produto de amplificação foi clonado no vetor pGEM T-Easy e sequenciado. O vetor, nomeado pGEMpNopC, foi digerido com HindIII e Sall. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e uma banda de aproximadamente 1,0 kb, correspondente à região promotora com o *tts-box*, foi purificada, utilizando o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®).

O vetor pROBE NT foi digerido com HindIII e Sall e ligado ao fragmento purificado, com a T4 DNA Ligase (Fermentas®), conforme especificações do fabricante. A ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias brancas foram inoculadas em meio LB com antibióticos e checadas por PCR com os primers pNopCFOR e GFP *anti*. O plasmídeo que amplificou a banda de tamanho esperado foi nomeado pNTpNopC.

#### 4.11 Conjugação tri-parental

Os plasmídeos construídos no item 4.8 foram transferidos para *B. elkanii* SEMIA587 e *B. elkanii*587 $\Omega$ ttsI através de conjugação tri-parental. As linhagens de *Bradyrhizobium* foram multiplicadas em meio YEM suplementado com antibióticos (Tc para 587 e Tc e Sp para 587 $\Omega$ ttsI) e incubadas à 28°C por cinco dias. As linhagens de *E. coli*, uma contendo o vetor com as construções de promotores fusionados à *gfp* (pPROBE NT e derivados) e a outra carregando o plasmídeo *helper* pRK2013 foram multiplicadas por 16 horas à 37°C em meio LB suplementado com Km (para ambas as linhagens). As bactérias foram plaqueadas simultaneamente em meio YEM sem antibióticos e incubadas à

28°C por 72 horas. Após esse período foram transferidas para novas placas contendo o meio YEM, agora suplementado com antibióticos (Tc e Km para 587 e Tc, Sp e Km para 587 $\Omega$ ttsI). As linhagens resultantes foram nomeadas: *B. elkanii* 587 pNT, *B. elkanii* 587 pNTpTtsI, *B. elkanii* 587 pNTNB, *B. elkanii* 587 pNTpNopC, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNT, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTpTtsI, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTNB e *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTpNopC.

#### 4.12 Ensaio de intensidade de expressão de GFP

As linhagens (*B. elkanii* 587 pNT, *B. elkanii* 587 pNTpTtsI, *B. elkanii* 587 pNTNB, *B. elkanii* 587 pNTpNopC, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNT, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTpTtsI, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTNB, *B. elkanii* 587 $\Omega$ ttsI pNTpNopC) foram multiplicadas em meio YEM com antibióticos até uma densidade ótica de 0,5 em 600 nanômetros (OD<sub>600</sub> 0,5) e diluídas para OD<sub>600</sub> 0,2 em meio YEM. A esse meio foram adicionados os tratamentos com os flavonoides: apigenina, daidzeína e genisteína (Sigma®) na concentração final de 10<sup>-6</sup> M e etanol como controle negativo. As bactérias foram mantidas em agitação e a 28°C. Após 24 horas de indução a densidade ótica (OD<sub>600</sub>) e fluorescência (filtros de excitação de 485 nm e de emissão de 550 nm) foram medidas de 100  $\mu$ l das culturas, em placas de 96 poços, utilizando o *SpectraMax Gemini XPS* (MDS Analytical Technologies). A densidade ótica foi corrigida ao nível de *background* utilizando o meio não inoculado. Pelo menos três repetições independentes para cada tratamento foram realizadas.

## 5. Resultados

### 5.1 *Bradyrhizobium elkanii* 587 possui o gene *ttsI*

O DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587 foi usado como molde em uma reação de amplificação utilizando *primers* desenhados a partir do alinhamento de sequências obtidas no GenBank, relativas a genes *ttsI* de outros rizóbios, como descrito no item 4.5 do Material e Métodos. Como resultado, foi obtido um fragmento de 364 pb. A Figura 6 apresenta o gel de agarose correspondente à amplificação. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM T-Easy, gerando o plasmídeo pGEMttsI, e sequenciado, utilizando *primers* universais (M13 FOR e REV), que anelam no vetor. A sequência gerada foi utilizada para alinhamentos, através da ferramenta nBLAST, do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). O resultado do alinhamento apontou similaridade com as sequências correspondentes aos genes *basR* de *B. japonicum* USDA 110, *y4xI* de *Rhizobium* sp. NGR234 e *y4xI* de *S. fredii*, linhagens USDA257 e HH103, além de sequências de genes que codificam proteínas de dois componentes de outras bactérias. A Figura 7 apresenta o alinhamento da sequência obtida com as sequências de *basR* de *B. japonicum* USDA110, *y4xI* de *Rhizobium* sp. NGR234 e *y4xI* de *S. fredii* USDA257.



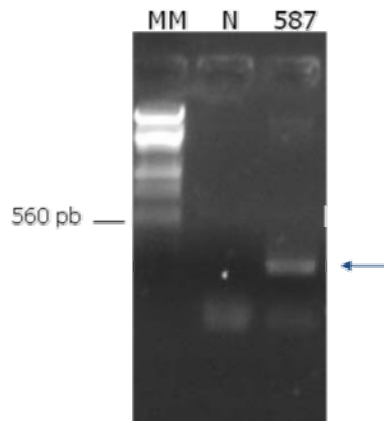


Figura 6: Gel de agarose 1,0% contendo o produto da amplificação do DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587 utilizando os *primers* ttsIFOR e ttsIREV. MM: marcador de peso molecular 1kb ladder (Invitrogen®); N: controle negativo da reação; 587: DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587. A seta indica o fragmento de 364 pb amplificado.

BasR	-----	-----	-----	-----	-----	--ATGATGAG	CAGTCTCAAT
TtsIclone	-----	-----	-----	-----	-----	-----ATGAG	CAGTCTCAAC
NGR234	CTGAGGCAGC	TAAGGAGCGA	CGGGTATTCA	GTTCTGCGG	TCATTATGAG	CAGGCTCGAC	CAGGCTCGAC
Sf	CTGAGGCAGC	TAAGGAGCGA	CGGGTATTCA	GTTCTGCGG	TCATTATGAG	CAGGCTCGAC	CAGGCTCGAC
Clustal Co						*****	*** ** *
BasR	GATCTCAGCC	GCCGGATCGC	GACCTTCAAT	GCGGGAGCGG	ATGATTTCCT	GCCCAAGCCT	
TtsIclone	GATCTCGGCC	GGCGGATTGC	GATCTTCAAT	GCGGGCGCGG	ACGATTTCCT	CCCCAAACCC	
NGR234	GATCTCGAGA	AACGAATTTT	GGTATTCAAT	AGTGGCGCGG	ACGATTTTCT	CCGTAAACCC	
Sf	GATCTCGAGA	AACGAATTTT	GGTATTCAAT	AGTGGCGCGG	ACGATTTTCT	CCGTAAACCC	
Clustal Co	*****	** ** *	* *****	** ** **	* *****	* *****	* ** ** *
BasR	GTGTGATCG	ACGAACTCAT	CGCTCGCATG	GCGGCCATTT	TGCGAAGGTC	AACGCAAATG	
TtsIclone	GTATCGACCG	AGGAACTCAT	CGCACGCATG	GCGGCCATTC	TGCGCGGTC	GACGCAAATG	
NGR234	GTCTCTACGG	ATGAGCTCAT	CGCCAGAATG	GCGGCCCTTC	TGCGCCGATC	GACACAGATC	
Sf	GTCTCTACGG	ATGAGCTCAT	CGCCAGAATG	GCGGCCCTTC	TGCGCCGATC	GACACAGATC	
Clustal Co	** * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *
BasR	ACGGCGCCGG	TCGTGACATT	GCGGAACTCG	CATTTTCGATC	CGATCGCCAG	ACAAGTCTCG	
TtsIclone	ACGGCGCCCG	TCGTGACATT	GCGCAATCTG	CACTTCGACC	CCATTGCGAG	GCAAGTCTCG	
NGR234	ACTTGCCCCA	TCATTGAATT	TGGCAACCTC	CACTTCGATC	CGATCGGCCG	ACAGGTGTCT	
Sf	ACTTGCCCCA	TCATTGAATT	TGGCAACCTC	CACTTCGATC	CGATCGGCCG	ACAGGTGTCT	
Clustal Co	** ** *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *
BasR	GTGGGTGGCC	GGATCCTGAG	GATTGCTCGG	CGTGAGGTGT	GCATTCTCGA	GCATCTGCTC	
TtsIclone	GTCGGTGGTC	GGATACTGAA	GATTGCCCGC	CGCGAAGTGT	GCATTCTTGA	ACATTGCTC	
NGR234	GTTGACGGTC	ATCCGCTAAT	GATCGCACGT	CGCGAACTAT	GCATTCTAGA	GCATCTGCTT	
Sf	GTTGACGGTC	ATCCGCTAAT	GATCGCACGT	CGCGAACTAT	GCATTCTAGA	GCATCTGCTT	
Clustal Co	** * * *	* * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *
BasR	AATCGCGCCG	GCCGCACCTG	GCCGCGCGCT	TCGCTGGAAG	ATAGCTTGTA	CGCGTTCGAT	
TtsIclone	AACCGTGGCG	GCCGCACCGT	GCCGCGCGCA	TCACTGGAGG	ACAGCCTGTA	CGCGTTCGAC	
NGR234	AACCGCGCAG	GTCGCATCGT	GCCGCGTGCG	CGGTTGGAAG	ATCAACTCTA	TTCGTTCAAC	
Sf	AACCGCGCGG	GTCGCATCGT	GCCGCGTGCG	CGGTTGGAAG	ATCAACTCTA	TTCGTTCAAC	
Clustal Co	** * * *	* *****	** *****	** * *	* * *	* * *	* * *
BasR	GACGAGTTT	CGACCAATGC	GCTGGAAGTC	GGGATTATC	GCTTACGCGC	GCATTTGAAC	
TtsIclone	GATGAGTCT	CGACCAATGC	GCTGGAAGTC	GGGATCTATC	GCCTGCGCA-	-----	
NGR234	GACGAAGTTT	CAGGCAACGC	GCTTGAAGCC	GGAATCTACC	GCTTACGCGG	GTATCTCAGT	
Sf	GACGAAGTTT	CAGGCAACGC	GCTTGAAGCC	GGAATCTACC	GCTTACGCGG	GTATCTCAGT	
Clustal Co	** * * *	* * * *	** * *	** * *	** * *	** * *	** * *

Figura 7: Alinhamento da sequência do fragmento amplificado com os fragmentos correspondentes aos genes *basR* de *B. japonicum* USDA110, *y4xI* de *Rhizobium* sp. NGR234 e *y4xI* de *S. fredii* USDA257. O programa Clustal X 1.81 foi utilizado para o alinhamento. Os asteriscos representam identidade entre as sequências. BasR: *basR* *B. japonicum* USDA110 (GenBank GeneID: 1054539), TtsIclone: sequência de *B. elkanii* SEMIA587 amplificada e clonada em pGEM T-Easy, NGR234: *y4xI* de *Rhizobium* sp. NGR234 (GenBank Gene ID: 962506), Sf: *y4xI* de *S. fredii* USDA257 (GenBank GeneID:19749312).

A sequência de nucleotídeos foi traduzida, utilizando a ferramenta *Translate Tool* do ExPASy ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)). A sequência de aminoácidos gerada foi utilizada para comparação, através do programa Blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), onde os domínios característicos de proteínas do tipo dois componentes foram identificados (Figura 8).

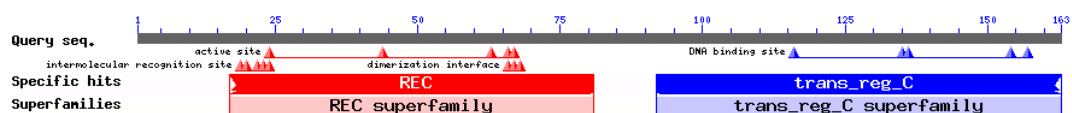


Figura 8: Resultado do programa Blastp ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), realizado com a sequência do fragmento de *ttsI* traduzido com a *Translate Tool* ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) mostrando os domínios conservados, identificados após o alinhamento. O domínio REC é o referente ao domínio receptor de sinal. O domínio *trans\_reg\_C* é referente ao domínio de ligação ao DNA, que representa a porção efetora da proteína. Ambos os domínios identificados são característicos de proteínas do tipo dois componentes.

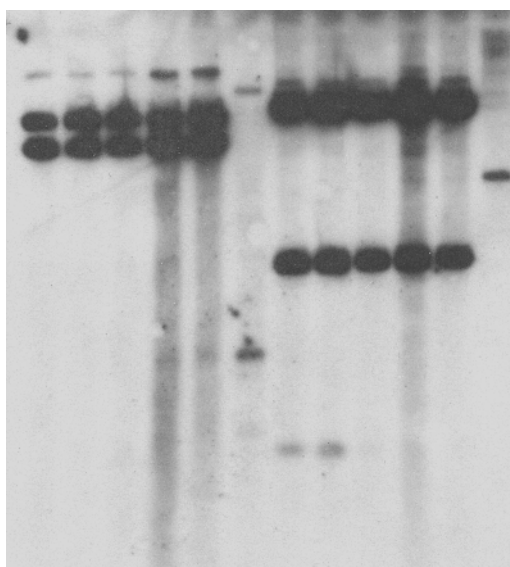
A comparação da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtida do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587 com a região correspondente da proteína BasR (referente à proteína TtsI) de *B. japonicum* USDA110 revelou uma similaridade de 97% e uma identidade de 95% entre as sequências. Em relação à proteína TtsI de *Rhizobium* sp. NGR234 foram observados os valores de 87% de similaridade e 76% de identidade entre as sequências comparadas. A sequência completa do gene *ttsI* de *B. elkanii* USDA61 foi recentemente publicada (Okazaki *et al.*, 2009), juntamente com sequenciamento completo do *cluster* do T3SS dessa linhagem de *B. elkanii*. A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos para a proteína TtsI completa não apresentou nenhum domínio adicional aos encontrados na sequência obtida para a proteína TtsI da linhagem de *B. elkanii* SEMIA587. A identidade da sequência de aminoácidos da proteína TtsI completa de *B. elkanii* USDA61 com BasR de *B. japonicum* USDA110 foi de 89%, com 93% de similaridade, enquanto que com TtsI de *Rhizobium* sp. NGR234 foi de 70% de identidade com 84% de similaridade. Entre as proteínas TtsI das duas linhagens de *B. elkanii*, a identidade e a similaridade foi de 100%.

## 5.2 Construção da linhagem mutante *B. elkanii* SEMIA587 $\Omega$ ttsI

O vetor pGEMttsI foi utilizado para a criação de uma construção contendo o fragmento do gene *ttsI* interrompido com um cassete de resistência aos antibióticos espectinomomicina e estreptomicina.

Uma conjugação tri-parental foi realizada (item 4.6 do Material e Métodos), para que a sequência do gene *ttsI* contendo a inserção fosse recombinada com a sequência do gene *ttsI* selvagem (cromossômica, sem a mutação), de modo que a inserção no gene *ttsI* fosse integrada no genoma. As colônias que apresentaram a resistência aos antibióticos corretos foram analisadas por PCR e, posteriormente, por Southern *blot* (Figura 9).

$\Omega$ 5  $\Omega$ 4  $\Omega$ 3  $\Omega$ 2  $\Omega$ 1 587  $\Omega$ 5  $\Omega$ 4  $\Omega$ 3  $\Omega$ 2  $\Omega$ 1 587



SalI

HindIII

Figura 9: Resultado da autorradiografia do Southern *blot* utilizando DNAs genômicos de diferentes linhagens transconjugantes de *B. elkanii* SEMIA587 e o fragmento amplificado do gene *ttsI* de 364 pb como sonda. Os DNAs foram extraídos conforme descrição no item 4.3 do Material e Métodos. A primeira metade da figura apresenta as digestões dos DNAs de diferentes transconjugantes com a enzima SalI; a outra metade da figura apresenta as digestões com a enzima HindIII. 587: DNA de *B. elkanii* SEMIA587;  $\Omega$ 1 a  $\Omega$ 5: DNAs de cinco diferentes colônias transconjugantes selecionadas para o experimento.

Os DNAs foram digeridos com uma enzima que não possui sítio de clivagem no

fragmento utilizado como sonda (HindIII), e outra que digere a sonda (Sall). O DNA de *B. elkanii* SEMIA587 apresentou, como esperado, uma banda para a enzima HindIII, de tamanho aproximado a 2,0 kb e duas bandas para Sall, de tamanhos aproximados de 400 pb e 6,0 kb. Os mutantes, da mesma forma, apresentaram as bandas de tamanho esperado para a digestão com essas enzimas: com HindIII foram observadas bandas de tamanhos aproximados a 600 pb e 4,0 kb, enquanto que para Sall, as bandas observadas foram de aproximadamente 3,5 kb e 4,0 kb. O mutante *B. elkanii*587 $\Omega$ ttsI1 foi escolhido para a continuação do trabalho.

A linhagem mutante apresentou as mesmas características fenotípicas da bactéria de tipo selvagem, apresentando apenas as resistências aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina como diferencial entre as duas linhagens.

### **5.3 Identificação do elemento *cis* *tts-box* nas regiões promotoras dos genes *ttsI* e *nopC***

Utilizando a técnica de *Site-Finding* PCR (Tan *et al.*, 2005) modificada, descrita no item 4.10.1 do Material e Métodos, foi realizada a amplificação da região promotora do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587. Utilizando o *primer* *ttsIREV* como *primer* gene-específico, foi possível a amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM T-Easy e posteriormente sequenciado. A sequência de nucleotídeos foi analisada e um motivo conservado *tts-box* foi identificado (Figura 10).

ACTCAACACACCACCTCGCACAGCGTCCCTCAAGCGGCCGCTTCGTCGCTGCCGC  
 ACTTGGCGCTCACGCCAAGGCGGACGTCT**GT**CAGTTTCGTCGAACCTCTTGGTC  
AACCGTGACGCGCTTAAGGTCTTGGCGTGTATGGACGAGAGGCGATGAA**ATG**CG  
 AATTCTCCTGGTTGATCATCATGCGGACTTTGCCCGTGCTGTGAAGGAAGCGCT  
 CCCCTATTGCGGGTTCGCAGTTGACGTGACACGCACGCTGGATGAGGCGGCGGC  
 CGCGCTGGATTGCGCCAAC . . . .

Figura 10: Região do genoma de *B. elkanii* SEMIA587 amplificada através da técnica de *Site-Finding* PCR. A sequência apresenta a região codificadora 5' e região promotora do gene *ttsI*. O sítio de início da tradução está marcado em vermelho (**ATG**). Na região promotora, em negrito e sublinhado, está a sequência consenso *tts-box*.

Como demonstrado na Figura 10, a sequência amplificada de 700 pb apresentou o início da região codificadora do gene *ttsI* (região 5') e uma parte da região promotora deste gene. Na região promotora foi identificado o motivo de ligação da proteína TtsI (*tts-box*). Este elemento *cis* se localiza 45 pb à montante (*upstream*) do início da tradução e apresentou homologia com a sequência consenso deste elemento. Sequências consenso para a ligação da proteína NodD1 (*nod-box*), no entanto, não foram identificadas na sequência amplificada.

A região promotora do gene *nopC* foi obtida através da amplificação de um fragmento contendo as sequências entre os genes *nopX* e *nopA*, com os primers e as condições de amplificação descritos no item 4.10.3 do Material e Métodos.

GCTTTGATGAACAACGGCTTGCCCTGATCAAGTGCCACATAGGCGAGGTCTTGTA  
 CCAACCCCTGTGATCTGCAGCTTACGCCGACACACTGCCGAAATATGAGGCGGCC  
 TGTCAGAGGCAACATCAAAGAGATCGGCTCACAGAATTTCTGAGGCT**CGTCAG**  
**CTTGTGAAAGCTAATGCTTCCATAGTAGCCGTGACGGCGACCGCTCCCTCCGC**  
 ACGAACGAAGTTTTGAAGTAGGAGAACC**CGATG**CGCATTTCCAGCTCTAGCGCC  
 GCTGGGCACCTTGATTCCGACCTCCACGCGACTGGCGGCGGCAAAAAGGATCT  
 CGGGCGCCTGGCGAGCACGA

Figura 11: Região amplificada correspondente ao promotor do gene *nopC* e a parte inicial (região 5') da sua região codificadora. O sítio de início da tradução está marcado em vermelho (**ATG**). A sequência consenso de ligação da proteína TtsI (*tts-box*) está sublinhada e em negrito.

Na região promotora do gene *nopC*, como esperado, foi encontrado o elemento *cis tts-box*, localizado 59 pb à montante (*upstream*) do início da tradução. Da mesma forma que o elemento encontrado na região promotora do gene *ttsI*, este demonstra um bom grau de homologia aos *tts-box* já descritos na literatura.

#### **5.4 Secreção de proteínas em resposta à indução por flavonoides**

Para testar a secreção de proteínas em resposta à indução por flavonoides as linhagens selvagem e mutante de *B. elkanii* SEMIA587 foram inoculadas em meio mínimo e a esse meio foi adicionado o flavonoide genisteína. Como controle negativo foi utilizado etanol (composto no qual o flavonoide foi diluído), adicionado ao meio da mesma forma que o flavonoide.

As proteínas secretadas foram extraídas 72 horas após a indução e foram submetidas a SDS-PAGE 12%. Dois géis foram preparados. Um deles foi utilizado para Western *blot* e o outro foi corado com nitrato de prata para visualização das proteínas. A mesma quantidade de proteínas foi aplicada em ambos os géis. A membrana para qual o gel foi transferido foi incubada com dois anticorpos diferentes ( $\alpha$ -NopA e  $\alpha$ -NopL), um de cada vez. A Figura 12 mostra os resultados desse experimento.

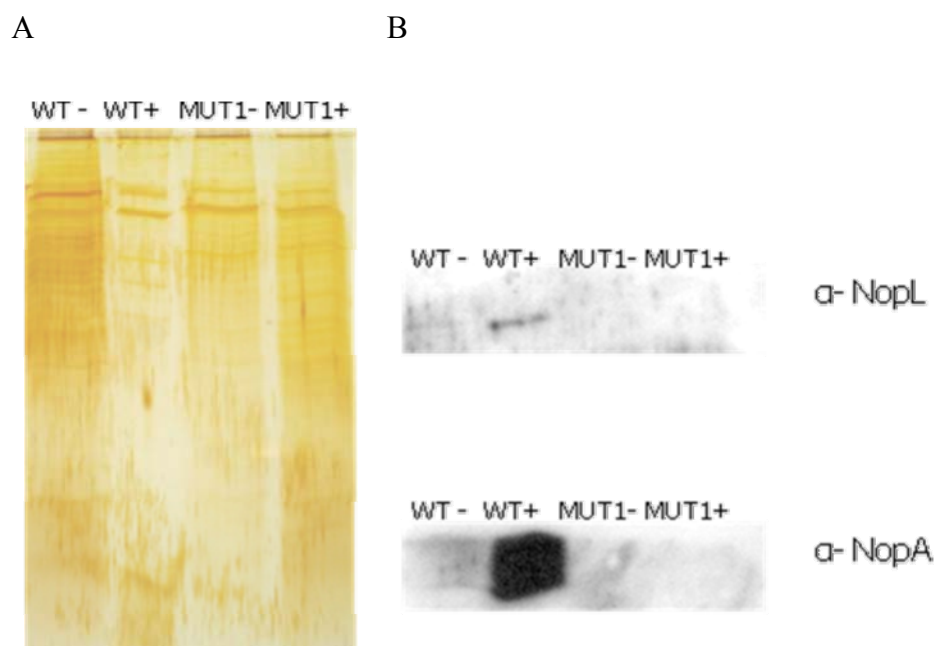


Figura 12: A) SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata (descrito no item 4.8 do Material e Métodos). B) Western *blot* com as proteínas secretadas extraídas, usando os anticorpos assinalados. WT: *B. elkanii* SEMIA587. MUT1: *B. elkanii* 587 $\Delta$ ttsI. +: genisteína. -: não induzido.  $\alpha$ -NopA: anticorpo contra a proteína NopA.  $\alpha$ -NopL: anticorpo contra a proteína NopL. Os anticorpos foram gentilmente cedidos pelos Dr William J. Broughton e Dr William J. Deakin (LBMPs- Universidade de Genebra).

Os resultados obtidos nesse experimento demonstraram que a indução de *B. elkanii* SEMIA587 por flavonoides, no caso a genisteína, promove a secreção de proteínas via T3SS, no caso, NopA e NopL. Além disso, o experimento demonstrou que a bactéria mutante não apresentou a secreção destas proteínas, mesmo após a indução por genisteína.

## 5.5 Ensaio de nodulação

As bactérias *B. elkanii* SEMIA587 de tipo selvagem e mutante para o gene *ttsI* foram testadas quanto à capacidade de induzir a formação de nódulos em alguns tipos de leguminosas. As plantas testadas foram soja [*Glycine max* (L.) Merrill], variedades Peking e McCall, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum*.

Os testes foram realizados com no mínimo três repetições e os nódulos foram



contados em dois tempos fixos (14 e 28 dias). Os resultados estão apresentados sob forma de gráficos na Figura 13. As Figuras 14, 15 e 16 apresentam o fenótipo das plantas estudadas.

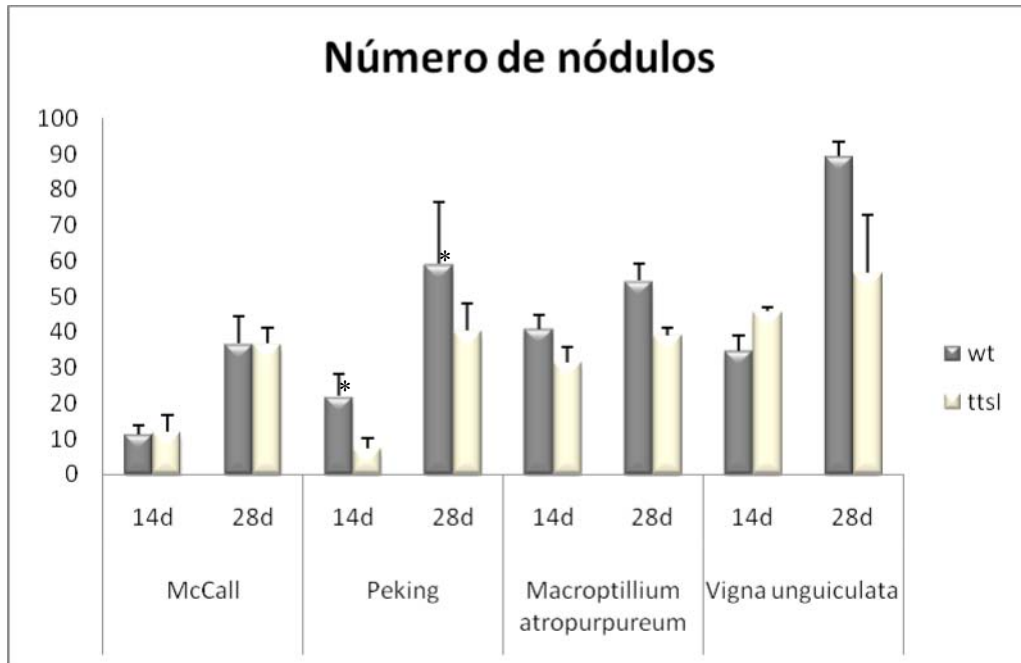


Figura 13: Gráfico apresentando os resultados de número de nódulos nos testes de nodulação realizados com as duas linhagens bacterianas, *B. elkanii* SEMIA587 de tipo selvagem e mutante. Os resultados são médias de três repetições. No eixo x estão descritas as variedades das plantas testadas e os pontos de coleta dos nódulos (14d: 14 dias e 28d: 28 dias). McCall e Peking são duas variedades de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. No eixo y estão os números de nódulos. As barras acima dos gráficos representam o desvio padrão calculado das repetições e os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes ( $P > 0.05$ ) pelo teste *t* de Student.

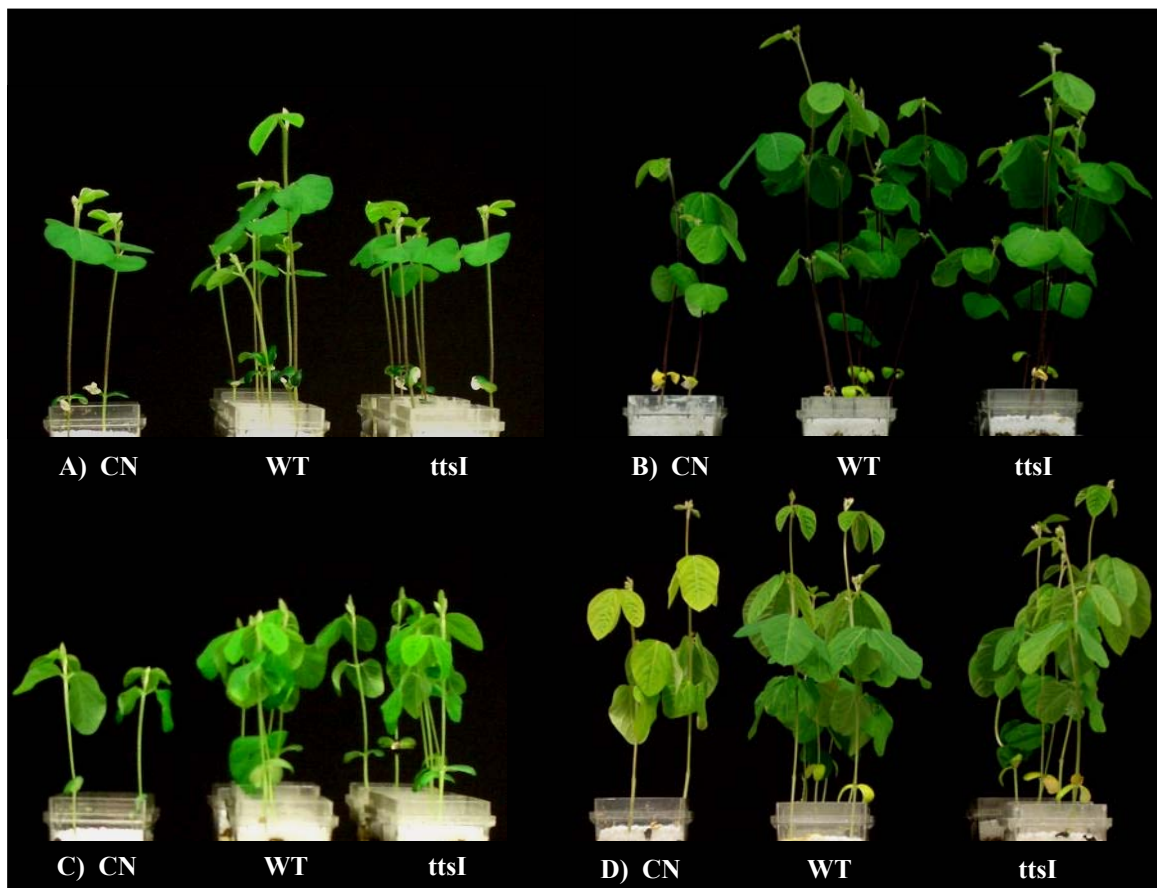


Figura 14: Testes de nodulação com soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. A e B: cultivar McCall; C e D: cultivar Peking. A e C: plantas com 14 dias; B e D: plantas com 28 dias. CN: controle negativo; WT: planta inoculada com *B. elkanii* SEMIA587; ttsI: planta inoculada com *B. elkanii* ΔttsI.

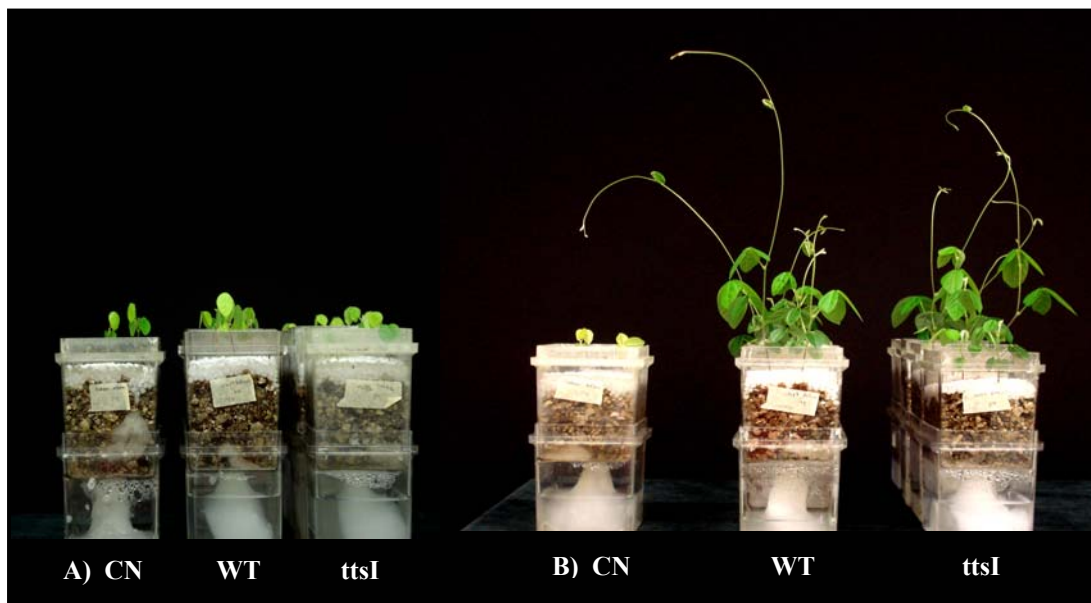


Figura 15: Testes de nodulação com *Macroptilium atropurpureum* A: plantas com 14 dias; B: plantas com 28 dias. CN: controle negativo; WT: planta inoculada com *B. elkanii* SEMIA587; ttsI: planta inoculada com *B. elkanii* ΔttsI.

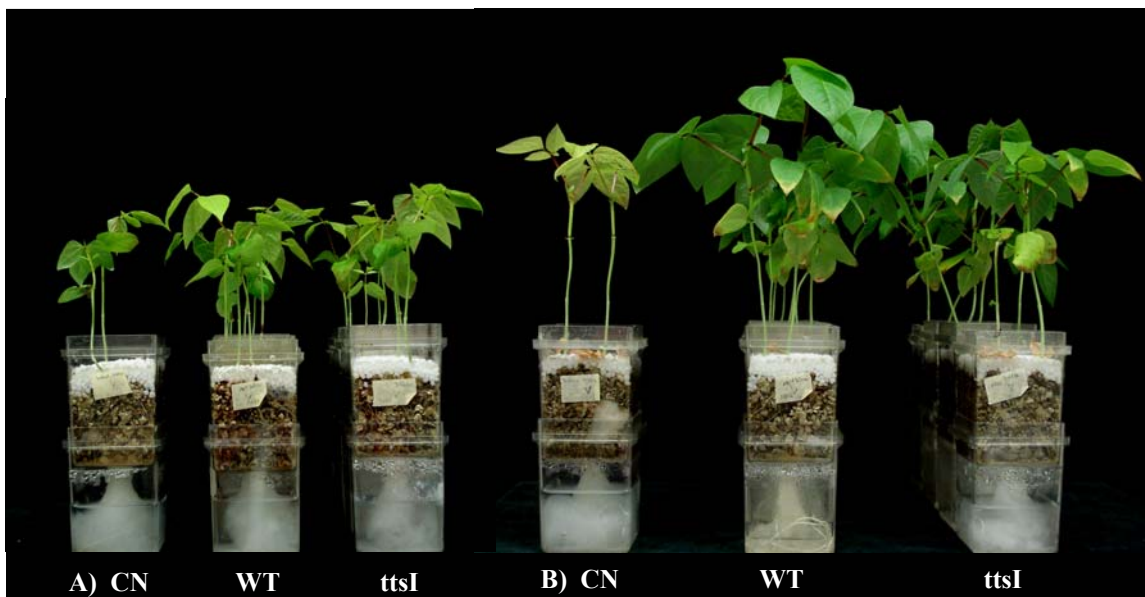


Figura 16: Testes de nodulação com *Vigna unguiculata* A: plantas com 14 dias; B: plantas com 28 dias. CN: controle negativo; WT: planta inoculada com *B. elkanii* SEMIA587; *ttsI*: planta inoculada com *B. elkanii*  $\Delta$ ttsI.

As bactérias de tipo selvagem e mutante se comportaram de maneira semelhante na maioria dos testes de nodulação, com exceção da cultivar de soja Peking, na qual a bactéria de tipo selvagem apresentou um número de nódulos significativamente maior em ambos os pontos de contagem de nódulos.

## 5.6 Clonagem dos elementos cis (*tts-box* e *nod-box*) no vetor pPROBE NT

Os *tts-box* anteriormente identificados (nas regiões promotoras dos genes *ttsI* e *nopC*) foram clonados no vetor pPROBE NT, que possui o gene repórter *gfp* sem promotor, no qual a sequência testada é fusionada. Os promotores foram inseridos e a orientação foi confirmada por PCR (como descrito no item 4.10 de Material e Métodos, dados não mostrados).

A região promotora do gene *nodA*, do operon *nodABC*, foi obtida através de amplificação utilizando *primers* desenhados a partir de sequências presentes no GenBank. A sequência obtida, de 222 pb, está mostrada na Figura 17.

```
ggctggctcaggttaatttggcgcgcgcgcgcgtgtgaggttgcgctccgtca  
ttagagcatcgagcgcgaacgagaagggttagatcaagtcccttgaaccgcat  
gtcgtgagtcctatccatcgtgtggatgtgttctatcgaaacaatcgatttta  
ccaaactgcggttgttggatagcaaacatcagtttggaaaatgaattaggt  
atgccacgatggct
```

Figura 17: Região do gene *nodA* mostrando o *nod-box* e região promotora do operon *nodABC*, de *B. elkanii*. O elemento *cis* está em negrito e sublinhado.

A região contendo o *nod-box* está localizada a 323 pb à montante (*upstream*) do início da tradução do gene *nodA*. A orientação da clonagem em pPROBE NT também foi verificada por PCR (dado não mostrado).

## 5.7 Análise da atividade de Gfp após indução por flavonoides

Com o objetivo de testar as respostas das diferentes regiões promotoras (*tts-box* e *nod-box*) frente à indução com diferentes flavonoides, os vetores pPROBE NT e suas derivações contendo as regiões promotoras foram transferidos para as duas linhagens de *B. elkanii* (selvagem e mutante *ttsI*). As bactérias transformantes foram induzidas com três flavonoides diferentes, apigenina, daidzeína e genisteína, além de um controle com etanol (composto no qual os flavonoides foram diluídos).

A atividade de Gfp foi medida através de absorbância em dois comprimentos de onda diferentes (excitação em 485 nm e emissão em 535 nm), além da densidade óptica das bactérias (600 nm). Os valores foram corrigidos em relação ao meio não inoculado e ao plasmídeo vazio. Os resultados são a média de três repetições independentes. O desvio padrão foi calculado de acordo com os valores das repetições. Os resultados estão apresentados sob forma de gráficos nas Figuras 18, 19 e 20.

Nesse experimento pode-se observar, primeiramente, a ativação dos promotores

estudados (na bactéria de tipo selvagem) em resposta aos flavonoides utilizados, 24 horas após a indução, com valores significativamente maiores que no controle negativo (etanol). Outra observação importante foi a ausência de resposta na bactéria mutante para o gene *ttsI*, mostrando um severo grau de resposta nesses promotores, corroborando com o resultado da análise de proteínas secretadas.

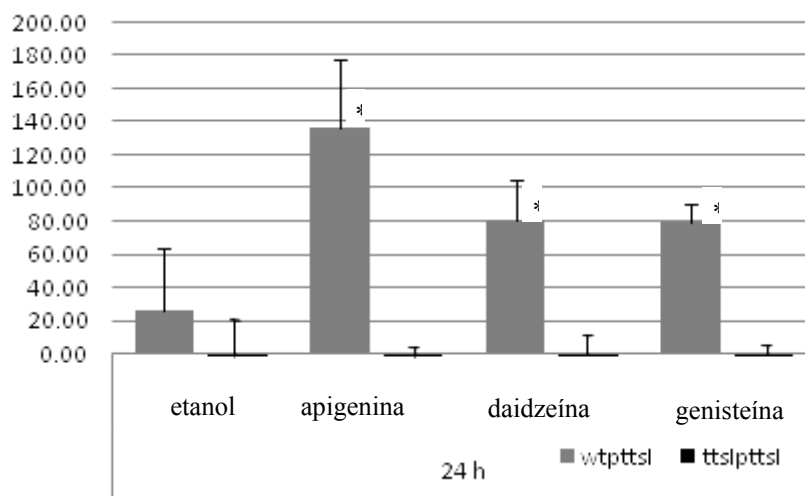


Figura 18: Representação gráfica da atividade de Gfp sob controle do promotor do gene *ttsI*, após indução pelos flavonoides e controle negativo. O gráfico apresenta resultados após 24 horas de indução, nas quatro condições: induções com etanol (controle negativo), apigenina, daidzeína e genisteína. As barras representam médias de três repetições e o desvio padrão calculado está nas linhas acima da barras. Os asteriscos representam valores estatisticamente significantes ( $P > 0,05$ ), em relação ao controle negativo, de acordo com o teste *t* de Student. Os tratamentos de flavonoides não diferem entre si. Em cinza estão apresentados os resultados para a linhagem de tipo selvagem e em preto estão apresentados os resultados para a linhagem mutante para o gene *ttsI*.

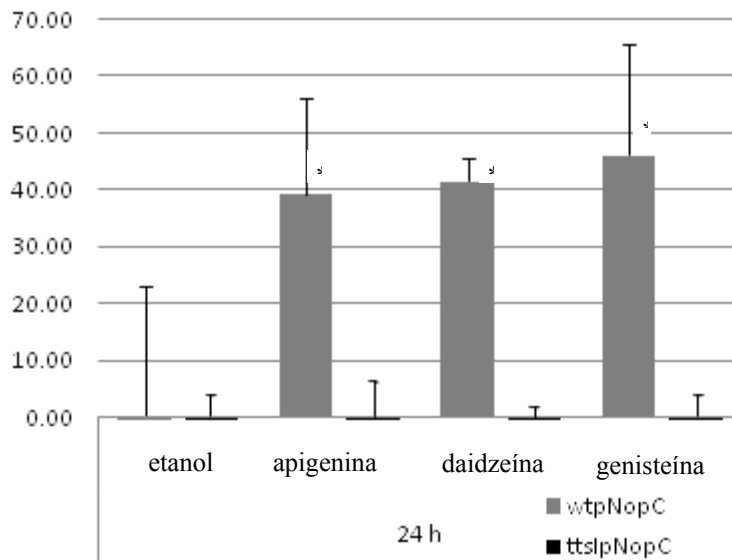


Figura 19: Representação gráfica da atividade de Gfp sob controle do promotor do gene *nopC*, após indução pelos flavonoides e controle negativo. O gráfico apresenta resultados após 24 horas de indução, nas quatro condições: induções com etanol (controle negativo), apigenina, daidzeína e genisteína. As barras representam médias de três repetições e o desvio padrão calculado está nas linhas acima da barras. Os asteriscos representam valores estatisticamente significantes ( $P > 0,05$ ), em relação ao controle negativo, de acordo com o teste *t* de Student. Os tratamentos de flavonoides não diferem entre si. Em cinza estão apresentados os resultados para a linhagem selvagem e em preto estão apresentados os resultados para a linhagem mutante para o gene *ttsI*.

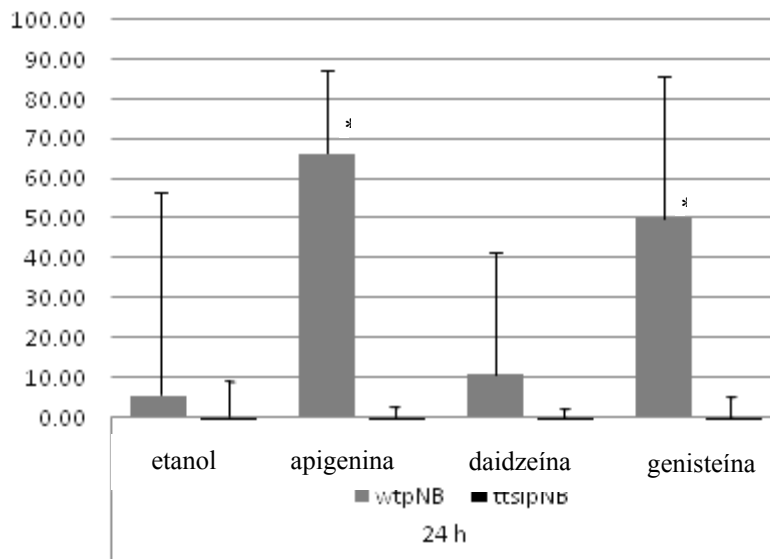


Figura 20: Representação gráfica da atividade de Gfp sob controle do promotor dos genes *nodABC*, após indução pelos flavonoides e controle negativo. O gráfico apresenta resultados após 24 horas de indução, nas quatro condições: induções com etanol (controle negativo), apigenina, daidzeína e genisteína. As barras representam médias de três repetições e o desvio padrão calculado está nas linhas acima da barras. Os asteriscos representam valores estatisticamente significantes ( $P > 0,05$ ), em relação ao controle negativo, de acordo com o teste *t* de Student. Em cinza estão apresentados os resultados para a linhagem selvagem e em preto estão apresentados os resultados para a linhagem mutante para o gene *ttsI*.

## 6. *Discussão*

Os diversos genes de rizóbios envolvidos no sistema de secreção do tipo III (T3SS) estão agrupados na região do genoma denominada *tts* e a secreção de proteínas externas, necessárias para o processo de nodulação (Nop, de *nodulation outer proteins*), necessita da presença de flavonoides e da proteína NodD1. No entanto, apenas um dos genes dessa região é precedido por um elemento *cis* do tipo *nod-box*, o gene *ttsI* (Viprey *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2002). A proteína TtsI tem sido classificada como um componente regulatório intermediário entre o ativador de transcrição NodD1 e os genes relacionados ao T3SS. Essa regulação se dá pela ligação de TtsI nas regiões promotoras dos genes-alvo, em sequências específicas chamadas *tts-box* (Krause *et al.*, 2002).

Desde a descoberta do T3SS em rizóbios, diversos trabalhos vêm sendo realizados e a organização do *cluster*, no qual os principais genes do sistema estão localizados, foi alvo de alguns estudos. Dentre os rizóbios, existe um considerável grau de conservação, principalmente nos genes estruturais (*rhc*), tanto na presença quanto na organização. Nos genes que codificam proteínas secretadas, via sistema de secreção do tipo III, as Nops, existe uma maior divergência entre as bactérias. NopX, por exemplo, está presente em *Rhizobium* sp. NGR234 (Viprey *et al.*, 1998), *Sinorhizobium fredii* (Lorio *et al.*, 2006) e *B. elkanii* USDA61 (Okazaki *et al.*, 2009), porém, não foi encontrada em *B. japonicum* USDA 110 (Gottfert *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2002; Süß *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, um fragmento do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587 foi obtido por PCR e este fragmento foi estendido, em sua região 5', através da técnica de *Site-Finding* PCR. Desta forma, um total de 595 nucleotídeos foram obtidos do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587. Uma vez que a sequência de *B. elkanii* USDA61 apresenta um total de 689 nucleotídeos (FM162234, GenBank) faltariam, ainda, 94 nucleotídeos da região 3' do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587 a serem determinados. A sequência de nucleotídeos obtida foi



traduzida para aminoácidos e os principais domínios e motivos presentes nessa sequência foram identificados.

Os motivos encontrados na sequência da proteína TtsI de *B. elkanii* SEMIA587 são os domínios de ligação à DNA e sinalização de resposta após indução do ambiente, via flavonoides. Estes são característicos de proteínas do tipo dois componentes, como já descrito para TtsI de outras bactérias (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; López-Baena *et al.*, 2008; Wassem *et al.*, 2008; Zehner *et al.*, 2008). Como já mencionado, esse sistema se caracteriza por duas proteínas “parceiras” atuando juntas da seguinte maneira: uma proteína sensora (quinase) auto-fosforila um resíduo de aspartato conservado. O fosfato é posteriormente transferido para a outra proteína parceira, um regulador de resposta. Os reguladores de resposta são proteínas com motivos de ligação ao DNA que regulam a transcrição de outros genes. Proteínas do sistema de dois componentes normalmente estão envolvidas em processos como quimiotaxia, osmorregulação, transporte de magnésio, tolerância ao pH, esporulação, ou resposta de espécies virulentas ao ambiente da célula hospedeira (Klose *et al.*, 1993).

As proteínas TtsI de *Rhizobium* sp. NGR234 e de outros rizóbios que possuem o T3SS são homólogas aos reguladores de resposta do sistema de dois componentes. Porém, nos rizóbios, a proteína TtsI apresenta um resíduo de glutamato (Marie *et al.*, 2004; Wassem *et al.*, 2008), ao invés do resíduo conservado de aspartato, que é oceptor primário do fosfato em outras proteínas do tipo de dois componentes. As proteínas OmpR de *E. coli* e NtrC de *Salmonella typhimurium* também apresentam o resíduo de glutamato, ao invés de aspartato (Klose *et al.*, 1993; Lan e Igo, 1998). Nessas bactérias, tal modificação de aminoácidos (glutamato pelo aspartato) leva a uma ativação constitutiva de OmpR e NtrC, driblando, então, o requerimento da proteína quinase sensora (Klose *et al.*, 1993; Lan e Igo, 1998). Essa observação levou à sugestão de que a proteína TtsI de

rizóbios poderia não necessitar de fosforilação para ser funcional. Ao invés disso, a resposta ao sinal ambiental (no caso a presença do flavonoide) provavelmente seria mediada pela ativação da transcrição de *ttsI* por flavonoides e NodD1. Uma vez expressa, a proteína TtsI irá ativar a transcrição dos demais genes por ela controlados (Marie *et al.*, 2004; Wassem *et al.*, 2008). Na sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtida do DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587, a troca de aspartato para glutamato (E51D), conservada em TtsI de rizóbios, também foi identificada. Com isso, pode-se inferir que a ativação dessa proteína em *B. elkanii* SEMIA587, da mesma forma que nos demais rizóbios, possa ocorrer de maneira independente de fosforilação.

No trabalho aqui apresentado foi construída uma linhagem mutante para o gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587, na qual o cassete  $\Omega$ , que apresenta resistência à espectinomicina, foi inserido, interrompendo a sequência deste gene. Nos diversos rizóbios que possuem o T3SS, mutações no ativador de transcrição TtsI também foram realizadas, com o intuito de desvendar o papel dessa proteína em diferentes aspectos da interação bactéria-planta (Viprey *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2002; López-Baena *et al.*, 2008; Wassem *et al.*, 2008).

No trabalho de Viprey e colaboradores (1998), onde o T3SS foi primeiramente descrito em rizóbios, na espécie *Rhizobium* sp. NGR234, uma linhagem mutante para o gene *ttsI* (anteriormente chamado de *y4xI* nesta bactéria) foi criada também utilizando o cassete  $\Omega$ , juntamente com uma linhagem mutante para o gene *rhcN*. Os fenótipos dessas linhagens foram estudados quanto à resposta em testes de nodulação com algumas plantas. Interessantemente, as duas linhagens apresentaram fenótipos diferentes em testes com a mesma planta (*Pachyrhizus tuberosus*). Concluiu-se, então, que apesar de ambos os genes (*rhcN* e *ttsI*) pertencerem ao T3SS, a função que os produtos destes genes desempenham difere, e, provavelmente, o produto do gene *ttsI* tenha funcionalidade em outros sistemas não relacionados somente ao T3SS (Viprey *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2004).

Em *B. japonicum* USDA110 uma série de mutantes deletérios (com deleções nos genes *ttsI*, *rhcC1*, *rhcN*, *y4yJ*, *rhcQ*, *rhcR*, *rhcJ*, *nolU* e *nolV*) foi construída, todos relacionados com o T3SS (Krause *et al.*, 2002). As sequências genômicas foram substituídas por um cassete contendo resistência ao antibiótico canamicina. Dentre os mutantes construídos, dois apresentaram a mutação em apenas um gene: *ttsI* ou *rhcC1*. Foi nesse trabalho (Krause *et al.*, 2002) que foi identificado o elemento *cis*, denominado de *tts-box*, no qual a proteína TtsI se liga para a ativação da transcrição. Testes de transcrição, utilizando o gene repórter *lacZ* foram realizados e foi comprovada a indução por genisteína, nessa bactéria. Além da identificação deste elemento *cis*, foi identificada na região promotora do gene *ttsI* o motivo *nod-box*, que já havia sido identificado na região promotora do gene *ttsI* em *Rhizobium* sp. NGR234 (Viprey *et al.*, 1998). NodD1 é o ativador da transcrição do gene *ttsI* nesta bactéria (Viprey *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2004).

Em *Sinorhizobium fredii* HH103 o gene *ttsI* foi identificado e uma linhagem mutante para esse gene foi obtida, utilizando novamente o cassete  $\Omega$  para interromper a sequência deste gene (López-Baena *et al.*, 2008). A comparação entre os fenótipos da bactéria mutante para o gene *ttsI* com uma linhagem mutante para um gene estrutural do sistema (no caso o gene *rhcJ*) levou os autores a supor que a relevância simbiótica do gene *ttsI* fosse maior que a do gene *rhcJ*, uma vez que, mesmo que o fenótipo tenha sido o similar ao do mutante em *rhcJ*, as diferenças mostraram-se mais drásticas em relação ao número de nódulos na cultivar Williams de soja com o mutante *ttsI* (de Lyra *et al.*, 2006; López-Baena *et al.*, 2008).

O primeiro mutante de *Rhizobium* sp. NGR234 criado para o gene *ttsI* (Viprey *et al.*, 1998) apresentou como característica a não complementação total das suas funções quando o gene era fornecido em um plasmídeo contendo a sequência completa do gene *ttsI* (Marie *et al.*, 2004), provavelmente porque a inserção do cassete  $\Omega$  poderia estar

interferindo na transcrição dos demais genes do operon, no caso os genes *rhcC2* e *y4xK*. Em um novo trabalho com a mesma bactéria, uma nova linhagem mutante para o gene *ttsI* foi criada, agora com uma deleção na sequência desse gene (Wassem *et al.*, 2008). Além da criação da linhagem mutante foi possível a identificação dos nucleotídeos essenciais para a ligação da proteína TtsI no elemento *tts-box*, através de mutações aleatórias, além da identificação da sequência na qual a TtsI se liga, através de experimentos de DNaseI *footprinting*, com as regiões promotoras de dois genes (*nopB* e *rmlB*) contendo o motivo *tts-box*.

Um fenótipo a ser analisado em bactérias mutantes para o T3SS é a capacidade de secreção de proteínas e a resposta à indução por flavonoides. A capacidade de secretar proteínas foi analisada na linhagem mutante de *B. elkanii* para o gene *ttsI* obtida e comparada com a linhagem de tipo selvagem. Extrações de proteínas secretadas foram realizadas após 72 horas de indução por genisteína ou etanol. As proteínas secretadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para o experimento de *Western blot*. Neste experimento, os anticorpos contra duas proteínas secretadas, NopA e NopL, produzidos a partir das proteínas de *Rhizobium* sp. NGR234, reconheceram suas proteínas correspondentes na linhagem selvagem de *B. elkanii* SEMIA587, quando a cultura foi induzida pelo flavonoide. Por outro lado, o reconhecimento pelos anticorpos foi quase inexistente nos extratos proteicos provenientes da cultura na qual o etanol foi utilizado. Isso demonstra que, em *B. elkanii*, genisteína funciona como um indutor para a secreção de proteínas do T3SS, dado até o momento ainda não conhecido.

No trabalho de Okazaki e colaboradores (2009) não foi possível a identificação de diferenças entre culturas de *B. elkanii* USDA61 induzidas ou não por flavonoides, em relação à secreção de proteínas via T3SS. Nesse trabalho, as proteínas secretadas somente

puderam ser diferenciadas após a comparação com o padrão de proteínas secretadas por uma linhagem mutante no gene *rhcJ*. O teste para identificação das proteínas secretadas foi o de eletroforese em duas dimensões, onde os pontos identificados nos géis correspondentes às proteínas da linhagem de tipo selvagem, que não estavam aparentes no gel das proteínas da linhagem mutante, foram analisados. Assim, algumas Nops foram identificadas, correspondentes a algumas das proteínas secretadas já identificadas em outros rizóbios, como por exemplo: NopA, NopB, NopL, NopP e NopX. É importante mencionar que o meio de cultivo para a indução da secreção de proteínas no trabalho de Okazaki e colaboradores (2009) foi diferente do utilizado para a secreção de proteínas nas linhagens de *B. elkanii* SEMIA587 (essa Tese), de forma que essa poderia ser a razão para resultados tão diferentes (falta de indução com genisteína X indução com genisteína). No trabalho de Okazaki e colaboradores (2009) foi utilizado o meio AG (arabinose gluconato, Sadowsky *et al.*, 1987), o qual poderia ter diminuído a eficiência de secreção de proteínas pela bactéria *B. elkanii* USDA61. Alguns componentes dos meios de cultura já foram descritos como tendo influência na secreção de proteínas, como, por exemplo, a baixa concentração de cálcio no meio aumenta a secreção de proteínas em *S. fredii* (Krishnan *et al.*, 2007). Neste trabalho, foram testadas diversas concentrações deste composto, e a secreção de proteínas foi inversamente proporcional à quantidade de cálcio adicionada ao meio de cultura, que nesse caso foi o meio RMS.

No experimento de *Western blot* realizado observou-se que a intensidade da banda obtida após a detecção foi maior com o anticorpo  $\alpha$ -NopA do que com o  $\alpha$ -NopL, apesar da mesma quantidade de proteínas ter sido utilizada em ambos os experimentos. Isso, provavelmente, foi devido às diferentes funções dessas duas proteínas. A proteína NopA, uma proteína pequena, de aproximadamente 7 kDa na maioria dos rizóbios, foi descrita como associada aos componentes de superfície de membrana e componente do pilus.

Portanto, NopA é uma proteína secretada, porém, sem a função de efetora nas células hospedeiras eucarióticas (Marie *et al.*, 2003; Deakin *et al.*, 2005). A proteína NopL, por sua vez, foi descrita como efetora em células vegetais, onde sua fosforilação por quinases da planta, do sistema de resposta e defesa, já foi demonstrada (Bartsev *et al.*, 2003; Bartsev *et al.*, 2004). Dessa forma, a quantidade maior de proteína NopA pode ser devida ao seu maior requerimento para a funcionalidade, que a proteína NopL.

Outro aspecto importante do experimento de Western *blot* foi a resposta da linhagem mutante de *B. elkanii* para o gene *ttsI* para a secreção de proteínas após a indução por genisteína. Nesse experimento, pôde-se comprovar que a linhagem mutante construída foi incapaz de secretar as proteínas NopA e NopL, mesmo após a indução com o flavonoide. Isso está de acordo com outros trabalhos com o gene *ttsI*, onde linhagens mutantes também foram testadas quanto à secreção de proteínas. Recentemente, uma linhagem mutante para o gene *ttsI* de *S. fredii* HH103 teve as suas proteínas secretadas extraídas e também submetidas ao Western *blot*, utilizando o anticorpo  $\alpha$ -NopA. Também nessa bactéria, a proteína NopA não foi detectada, mesmo após a indução com genisteína (López-Baena *et al.*, 2008). Quando a linhagem mutante foi complementada com um plasmídeo contendo a sequência completa do gene *ttsI* selvagem, a proteína NopA foi detectada, demonstrando que a não funcionalidade da proteína TtsI impede a secreção de outras proteínas, e que o fenótipo de tipo selvagem pode ser restaurado na linhagem mutante por complementação com a cópia gênica original.

Um outro aspecto muito interessante para ser estudado, relacionado ao T3SS em rizóbios, é a resposta da planta hospedeira. Como o sistema foi primeiramente descrito e estudado em bactérias patogênicas a sua função em simbioses ainda não é totalmente esclarecida. A hipótese atualmente aceita é a de que a função desse sistema em bactérias simbioses seja similar à de bactérias patogênicas, ou seja, de driblar as defesas da planta.

Nas bactérias simbiotes isso melhoraria a eficiência da interação com parceiros compatíveis. Na maioria dos estudos realizados, bactérias mutantes para algum dos genes do T3SS apresentaram algum tipo de resposta diferente em relação a testes de nodulação, quando comparadas com bactérias de tipo selvagem. Quando linhagens mutantes para genes do T3SS foram testadas, três tipos de fenótipos foram encontrados: aumento no número de nódulos, diminuição no número de nódulos, ou ainda um fenótipo neutro, sem diferença para a bactéria de tipo selvagem. A diminuição no número de nódulos indica que o T3SS é benéfico na interação com determinada planta que está sendo estudada. De forma oposta, um aumento no número de nódulos indica que o T3SS não é benéfico na interação entre a bactéria e determinada planta. O fenótipo neutro indica que o T3SS não produz nenhum efeito na interação. Uma vez que alguns rizóbios não apresentam esse sistema, parece que ele não é essencial para a interação bactéria-planta, que culmina com a formação de nódulos. Linhagens de *Sinorhizobium meliloti* (2011) e *Mesorhizobium loti* (NZP4010) que não apresentam o T3SS provavelmente utilizam outro método para a interação (Viprey *et al.*, 1998).

Dentre os diversos trabalhos que surgiram com T3SS e rizóbios, a partir de Viprey e colaboradores (1998), uma grande variedade de bactérias e mutantes foi testada com várias plantas leguminosas diferentes. Os três tipos de fenótipos possíveis foram observados. Dessa forma, muitos dos efetores puderam ser identificados e a importância de cada um pode ser caracterizada para cada planta hospedeira testada.

No presente trabalho, três plantas hospedeiras diferentes foram testadas e dois tipos de fenótipos foram observados (Figura 13). As duas variedades de soja que foram analisadas, McCall e Peking, apresentaram diferentes respostas frente as duas linhagens de *B. elkanii* testadas (selvagem e mutante para o gene *ttsI*). A variedade McCall não apresentou diferença significativa entre a linhagem de tipo selvagem e a mutante em

relação ao número de nódulos, tanto após 14 quanto após 28 dias de inoculação. Já na variedade Peking, um número significativamente maior de nódulos, tanto após 14 quanto após 28 dias de inoculação, foi observado na linhagem de tipo selvagem, principalmente após 14 dias de inoculação, em relação à bactéria mutante. Nas outras plantas testadas (*Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*) a bactéria mutante apresentou um fenótipo neutro em comparação com a bactéria de tipo selvagem. As plantas de *M. atropurpureum* apresentaram um valor de número de nódulos superior quando inoculadas com a bactéria de tipo selvagem, em comparação com as inculadas com a bactéria mutante, esse valor, porém, não foi estatisticamente significativo. Com as plantas de *V. unguiculata* nenhuma tendência de diferença entre as bactérias pôde ser percebida.

O resultado dos testes de nodulação pode, também, se apresentar como um “atraso” na formação de nódulos, o que foi descrito para mutantes no gene *ttsI* em *B. japonicum* USDA110 (Krause *et al.*, 2002). Nesse trabalho, o resultado foi obtido em testes de nodulação com soja, variedade Williams. Após 14 dias de inoculação, o fenótipo negativo (menor número de nódulos) foi bem mais evidente, enquanto que após 28 dias a bactéria foi capaz de recuperar o número de nódulos, em comparação com a linhagem de tipo selvagem. No teste com *M. atropurpureum* o fenótipo foi bem mais expressivo, apresentando uma diminuição no número de nódulos em ambos os pontos de análise (14 e 28 dias após a inoculação), indicando que, para essa interação, o T3SS, especificamente o gene *ttsI*, foi essencial para a formação dos nódulos. Nas plantas de *V. unguiculata* não houve diferenças estatisticamente significativas entre as bactérias selvagem e mutante (Krause *et al.*, 2002).

Em *S. fredii* HH103, os fenótipos obtidos com o mutante *ttsI* em testes de nodulação com diversas variedades de soja (Williams, Peking, Heinong 33, Tribune e Kochi) foram mais evidentes, todos apresentando uma diminuição no número de nódulos,



quando comparados com a bactéria de tipo selvagem (López-Baena *et al.*, 2008). Os demais testes realizados nesse trabalho também mostraram algum tipo de fenótipo com o mutante construído: com *Erythrina variegata* (L.) como planta hospedeira, as plantas apresentaram um aumento no número de nódulos em comparação com as plantas inoculadas com a bactéria de tipo selvagem; com *Glycyrrhiza uralensis* as plantas tiveram uma diminuição no número de nódulos em comparação com as plantas inoculadas com a bactéria de tipo selvagem. Em *S. fredii* HH103 os fenótipos do mutante *ttsI* se apresentaram mais dramáticos que aqueles observados em mutantes no gene estrutural *rhcJ* (de Lyra *et al.*, 2006).

Com o mutante  $\Omega$ ttsI de *Rhizobium* sp. NGR234 foram primeiramente realizados testes de nodulação com quatro plantas diferentes (Viprey *et al.*, 1998), duas (*Pachyrhizus tuberosus* e *Vigna unguiculata*) que formam nódulos determinados, que caracteristicamente não possuem meristema e as bactérias se diferenciam em sincronia (Mergaert *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007), e duas (*Leucaena leucocephala* e *Tephrosia vogelii*) que formam nódulos indeterminados, nos quais a atividade de divisão celular não cessa e meristemas apicais são formados (Mergaert *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). O fenótipo observado na linhagem mutante foi semelhante ao da linhagem de tipo selvagem (neutro) quando *V. unguiculata* foi utilizada como planta hospedeira. Fenótipos divergentes entre as linhagens mutantes, entretanto, foram obtidos com *L. leucocephala* e *P. tuberosus*. Após essas observações foi levantada a hipótese de que o produto do gene *ttsI* estaria envolvido em funções adicionais às do T3SS.

Dentre os diversos trabalhos realizados com *Rhizobium* sp. NGR234, vários genes tiveram seus produtos caracterizados através de testes de nodulação, com proteínas importantes do sistema sendo identificadas dessa maneira. Entre as Nops do T3SS que tiveram a nomenclatura estabelecida a partir do trabalho de Marie e colaboradores (2001),

NopA, NopB, NopC, NopJ, NopL, NopM, NopP, NopT e NopX (Viprey *et al.*, 1998; Bartsev *et al.*, 2003; Marie *et al.*, 2003; Ausmees *et al.*, 2004; Bartsev *et al.*, 2004; Deakin *et al.*, 2005; Saad *et al.*, 2005; Skorpil *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008; Kambara *et al.*, 2008), NopA e NopB foram descritas como importantes na formação do pilus para a secreção de proteínas efetoras, como, no caso, NopL e NopX. Com a descoberta das funções de todas essas proteínas extracelulares está sendo possível aprender mais sobre o modo de ação das proteínas efetoras em bactérias simbiotes e traçar um paralelo com proteínas de virulência, secretadas via T3SS em bactérias patogênicas.

No recente trabalho de Okazaki e colaboradores (2009) testes de nodulação foram realizados com a bactéria *B. elkanii* USDA61 de tipo selvagem e dois mutantes construídos, um para o gene *rhcC2* e outro para o gene *rhcJ*, tendo plantas de soja, variedades Clark *rj1* e Hill (*Rj4*), *M. atropurpureum* e *Vigna radiata*, variedades CN36 e KPS1, como plantas hospedeiras. Foi analisado o número de nódulos 25 dias após o inóculo das bactérias e as linhagens mutantes foram comparadas com a bactéria de tipo selvagem. Foi observado em *M. atropurpureum* que os mutantes induziram um número menor de nódulos, porém, estes se apresentaram maiores que os induzidos pela bactéria de tipo selvagem. Já na variedade CN36 de *V. radiata* as três bactérias não apresentaram diferenças significativas em relação ao número de nódulos. A variedade KPS1 de *V. radiata*, no entanto, apresentou a formação de nódulos apenas nas plantas inoculadas com as bactérias mutantes. As variedades de soja Hill e Clark *rj1* são caracterizadas genotipicamente como *Rj4Rj4* e *rj1rj1*, respectivamente. A variedade Hill não formou nódulos com a bactéria de tipo selvagem, mas sim com as bactérias mutantes. Em contraste, a cultivar Clark *rj1* foi nodulada pela bactéria de tipo selvagem com maior eficiência. O alelo dominante *Rj4* de soja é muito difundido entre as cultivares de soja da região do Sudeste da Ásia e é responsável por uma resposta de nodulação ineficiente com

*B. elkanii* USDA61. Entretanto, os mutantes testados no trabalho de Okazaki e colaboradores (2009) foram capazes de induzir a formação de nódulos na cv. Hill, que possui o alelo *Rj4*. Já o contrário ocorreu com as plantas da cv. Clark, normalmente noduladas pela linhagem *B. elkanii* USDA61. Os mutantes, nesse caso, perderam a capacidade de induzir a formação de nódulos. Esse trabalho ressaltou, então, a importância da capacidade da planta hospedeira em reconhecer os fatores da bactéria na interação, para que ocorra uma nodulação eficiente.

Como comentado anteriormente, nos testes realizados com a linhagem mutante de *B. elkanii* SEMIA587 para o gene *ttsI*, a cv. Peking apresentou um número significativamente menor de nódulos quando inoculada com a bactéria mutante, enquanto que a cv. McCall não apresentou diferença entre as duas linhagens testadas. Essas discrepâncias entre as cultivares poderiam ser justificadas devido a diferenças existentes entre elas. A cultivar Peking é uma cultivar antiga e de origem asiática, enquanto que a McCall é mais moderna e de origem norte-americana. Devine e Kuykendall (1996) relataram que cultivares de soja de origem asiática e com o genótipo *Rj4*, como é o caso da cultivar Peking, são ineficientes na nodulação com determinadas linhagens de *B. elkanii*. Essa situação não é observada com cultivares de soja mais modernas e de origem norte-americana, como é o caso da cv. McCall (cujo genótipo não é conhecido). Meinhardt e colaboradores (1993) demonstraram que a linhagem USDA257 de *S. fredii* de tipo selvagem, uma bactéria de origem asiática, apresentou respostas bem diferentes em relação a essas mesmas cultivares de soja (Peking e McCall), sendo eficiente na formação de nódulos com a cv. Peking e incapaz de induzir a formação de nódulos na cv. McCall (Meinhardt *et al.*, 1993; Pueppke *et al.*, 1998). No entanto, outras linhagens de *S. fredii* foram eficientes na nodulação e fixação de nitrogênio em ambas as cultivares (Pueppke *et al.*, 1998). No caso da linhagem USDA257 de *S. fredii* o locus gênico *noIXWBTUV* foi

descrito como sendo o responsável pelo fenótipo de não nodulação da cv. McCall, uma vez que esse locus, além de estar associado ao T3SS nessa bactéria, é conhecido, também, como locus de especificidade de hospedeiro (Viprey *et al.*, 1998).

Através do sequenciamento de uma região compreendendo a porção 5' do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587 foi possível a identificação do elemento *cis tts-box*, posicionado a 45 pb do sítio de início da tradução (ATG). Essa sequência mostrou-se conservada com a sequência consenso para este elemento. Em toda a região sequenciada, no entanto, não foi possível a identificação de nenhum outro elemento *cis* regulatório.

A descoberta do *tts-box* na região promotora do gene *ttsI* surgiu de forma inesperada, pois em todos os rizóbios até agora estudados e que possuem o T3SS, o elemento presente na região promotora deste gene é o *nod-box* (Viprey *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; López-Baena *et al.*, 2008). Inclusive, o trabalho que descreve o sequenciamento do agrupamento de genes do T3SS na linhagem USDA61 de *B. elkanii* (Okazaki *et al.*, 2009) não menciona a presença deste elemento *cis* na região promotora do gene *ttsI*, e, sim, um de um elemento *nod-box* localizado duas ORFs à montante (*upstream*) do gene *ttsI*. Desta forma, a análise da funcionalidade da sequência *tts-box* como promotor se fez necessária, uma vez que esta característica se mostrou exclusiva de *B. elkanii* SEMIA587.

No presente trabalho foram isolados os promotores dos genes *ttsI* e *nopC* (ambos contendo o *tts-box*), além do promotor do operon *nodABC*, contendo o *nod-box*. Essas regiões foram fusionadas ao gene repórter *gfp* sem a região promotora e foram testadas quanto à indução por flavonoides nas linhagens de *B. elkanii* SEMIA587 de tipo selvagem e mutante para o gene *ttsI*. Foram utilizados três flavonoides e as leituras foram realizadas após 24 horas de indução. Os resultados obtidos demonstraram a indução por flavonoides nos três promotores testados, para a linhagem de tipo selvagem. A linhagem mutante,

como esperado, não apresentou a ativação dos promotores *tts-box*. Surpreendentemente, a construção com o *nod-box* apresentou uma resposta diferente na linhagem mutante, em relação à obtida com a linhagem de tipo selvagem. Esse resultado não era o esperado porque a mutação criada (no gene *ttsI*) foi em um gene situado em uma posição posterior na cascata de ativação que foi proposta para os outros rizóbios (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004), na qual o gene *nodD1* é ativado na presença dos flavonoides e a proteína resultante (NodD1) é responsável pela ativação do gene *ttsI*. Portanto a ativação dos genes *nod* seria dependente somente de NodD1, não tendo relação aparente com a proteína ausente no mutante (TtsI).

Os ensaios de expressão realizados em *B. japonicum* USDA110 com genes do T3SS fusionados ao gene repórter *lacZ*, com a bactéria de tipo selvagem e mutante para o gene *ttsI*, levaram à identificação de características importantes da proteína TtsI nesta bactéria (Krause *et al.*, 2002). Quando a bactéria de tipo selvagem foi multiplicada com genisteína, os genes *ttsI*, *nopL*, *rhcV*, *nolU* e *id205* foram induzidos. Foi verificado, também, que a expressão dos genes *nopL*, *rhcV* era dependente da proteína TtsI, uma vez que a expressão foi diminuída quando as fusões foram testadas na linhagem mutante para o gene *ttsI*. Surpreendentemente, os mesmos genes mencionados anteriormente, mesmo não sendo precedidos por um *nod-box* são regulados por NodW e NodD, de forma dependente de flavonoides (Krause *et al.*, 2002). Foi, então, proposto um modelo para a ativação dos genes do T3SS em *B. japonicum* USDA110, no qual os produtos dos genes *nodD1* e *nodW* são responsáveis pela ativação da transcrição do gene *ttsI*. O produto deste gene, por sua vez, irá se ligar nas regiões específicas dos promotores dos genes por ele regulados, no caso os elementos *cis tts-box*, localizados na região promotora dos genes do T3SS. É importante ressaltar que a proteína NodW, em *B. japonicum*, é um importante regulador dos genes de nodulação e faz parte de sistemas de dois componentes (com NodV),

responsivos a flavonoides (Gottfert *et al.*, 1990; Gottfert *et al.*, 1992; Loh *et al.*, 1997), regulador este que não possui função em *Rhizobium* sp. NGR234. A espécie *B. elkanii*, que não possui a sequência completa do seu genoma sequenciada não teve estudos de regulação neste nível, portanto, seria de extrema importância a elucidação de componentes como NodVW, que poderiam estar influenciando o modo de ativação do T3SS.

A ativação das regiões promotoras contendo o *tts-box* de ambos os genes (*ttsI* e *nopC*) na linhagem de tipo selvagem apresentou resposta de forma similar, em relação aos flavonoides preferencialmente utilizados. Os dois flavonoides de soja, daidzeína e genisteína, foram eficientes na ativação dos promotores. Os três flavonoides, incluindo apigenina, no entanto, foram capazes de induzir a ativação dos promotores, e por consequência, aumentaram a atividade da Gfp, que pode ser detectada através de fluorescência. Em relação ao promotor contendo o elemento *cis nod-box*, do operon dos genes *nodABC*, as bactérias que foram induzidas por apigenina e genisteína apresentaram um maior grau de ativação do que as bactérias induzidas com genisteína, porém, todos os flavonoides apresentaram indução da atividade de Gfp quando comparados com o controle negativo (etanol).

A sequência correspondente à região promotora do gene *nopC*, que contém o *tts-box*, foi escolhida para a análise para que houvesse a comparação com o outro *tts-box*, anteriormente isolado, da região promotora do gene *ttsI*. Ambos os elementos se mostraram conservados com a sequência consenso para o *tts-box* de outros rizóbios. De maneira geral, os elementos responderam de forma semelhante à indução por flavonoides, quando testados na bactéria de tipo selvagem.

A hipótese que surge ao analisar os resultados obtidos para os promotores contendo o *tts-box* na bactéria mutante é que a de que a proteína TtsI, quando presente, poderia se ligar ao *tts-box* para a ativação da transcrição dos genes. Assim, na ausência dessa proteína

o promotor não vai responder ao estímulo dos indutores (flavonoides). Em *Rhizobium* sp. NGR234 um mutante contendo uma deleção no gene *ttsI* foi testado quanto a ativação do promotor do gene *nopB*, que contém o *tts-box*, após a indução com apigenina. De forma semelhante a que ocorreu em *B. elkanii*, a atividade de Gfp nessa situação se reduziu aos níveis dos controles negativos (Wassem *et al.*, 2008). Nesse trabalho, além do mutante *ttsI* foram testadas mutações no *tts-box*. Na bactéria de tipo selvagem tais mutações também reduziram a atividade de Gfp ao nível do controle negativo. Esse estudo permitiu a identificação dos nucleotídeos essenciais para a atividade do *tts-box* em *Rhizobium* sp. NGR234. Ensaio de retardamento em gel demonstraram, também, a ligação da proteína TtsI no *tts-box* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Wassem *et al.*, 2008).

Em *B. japonicum* USDA110 foi medida a atividade do promotor do gene *nopB* e diversas mutações de nucleotídeos da sequência do *tts-box* deste gene foram promovidas, com o objetivo de testar quais nucleotídeos eram essenciais para a ativação do promotor (Zehner *et al.*, 2008). Foram utilizadas fusões com o gene repórter *lacZ* e a indução foi realizada após a adição de genisteína. Conforme o estudo, a atividade do promotor foi diretamente relacionada com a sequência consenso do elemento *cis* e dependente da adição do indutor.

Em uma abordagem diferente, a ativação do gene *ttsI* foi medida em *S. fredii* HH103 e foram definidos os flavonoides que melhor induziram o gene, através da atividade do gene repórter *lacZ* (López-Baena *et al.*, 2008). Nesse trabalho, os flavonoides daidzeína, genisteína, apigenina, coumestrol e morina se mostraram mais eficientes na ativação do gene *ttsI* nesta bactéria. Interessantemente, a adição de cópias extras do gene *ttsI* induziram uma expressão constitutiva dos genes *nopX*, *rhcJ* e *nopA*, mesmo sem a adição de flavonoides. No entanto, a adição de cópias extras do gene *nodDI* não foi capaz de induzir constitutivamente o gene *ttsI*. E apesar de uma expressão constitutiva, a adição

das cópias extras de *ttsI* não levaram a uma maior quantidade de proteínas secretadas, o que levou a sugestão de que exista algum outro nível de regulação posterior à transcrição, nesta bactéria (López-Baena *et al.*, 2008).

Ainda não está claro como ocorre a regulação dos genes do T3SS em *B. elkanii* SEMIA587, porém alguns elementos importantes para esta regulação foram desvendados nesse trabalho: os flavonoides são capazes de induzir a expressão dos genes do T3SS; genisteína induz a secreção de pelo menos duas Nops (NopA e NopL); a linhagem mutante para o gene *ttsI* é incapaz de secretar estas mesmas Nops, mesmo após a indução com genisteína; a região promotora do gene *ttsI* possui um *tts-box*, e este é ativo e responde à indução por flavonoides. Dessa forma, a transcrição do gene *ttsI* em *B. elkanii* SEMIA587 parece estar sendo auto-regulada: a ausência da proteína TtsI ligada ao *tts-box* resulta na falta de transcrição do gene *ttsI*. Além disso, testes de nodulação com três diferentes plantas leguminosas demonstraram que o T3SS em *B. elkanii* SEMIA587 também possui a característica de dependência de hospedeiros, como em outros rizóbios estudados (Viprey *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2002; López-Baena *et al.*, Okazaki *et al.*, 2009).



## 7 *Considerações finais*

A importância de bactérias diazotróficas e suas relações com as plantas já foram amplamente discutidas em diversos trabalhos. Entre estas bactérias encontra-se um grupo mais intimamente relacionado com as plantas, que são os rizóbios. Os rizóbios possuem a capacidade de induzir a formação de um novo órgão pela planta hospedeira, chamado de nódulo, no qual a bactéria irá se localizar e, após a perda da membrana, se transformará em bacteroide. Dessa forma, a bactéria inicia o processo de fixação biológica de nitrogênio, fornecendo à planta o composto fixado. Esse processo é específico se dá de forma específica, isto é, em plantas e bactérias que possuam reconhecimento mútuo. O reconhecimento se faz através da liberação de compostos fenólicos (flavonoides) pelas raízes das plantas, que são reconhecidos como sinalizadores pelas bactérias, que, então, iniciam a transcrição de genes de nodulação que, por sua vez, irão ser reconhecidos pela planta. Após esse “diálogo molecular” inicial uma série de eventos na raiz da planta promove a entrada da bactéria por uma brecha de infecção, guiando as bactérias para o novo órgão formado, o nódulo. Os principais fatores na troca de sinais entre os parceiros de simbiose são os flavonoides liberados pelas raízes das plantas e os fatores Nod, produzidos pelos produtos dos genes de nodulação das bactérias. Outros fatores, porém, também são essenciais, principalmente no que diz respeito ao espectro de plantas hospedeiras em que um determinado rizóbio pode induzir a formação de nódulos. Entre esses fatores adicionais se encontra o Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS). O sistema é capaz de secretar proteínas efetoras diretamente no citoplasma da célula vegetal hospedeira e, dessa forma, interagir com a maquinaria de resposta de defesa das plantas, aumentando a eficiência da nodulação.

Dentre os rizóbios já estudados, a maioria apresenta os genes previstos para um T3SS funcional, além de genes que codificam proteínas secretadas. Na bactéria *B. elkanii* o

primeiro trabalho descrevendo o T3SS surgiu somente em 2009 (Okazaki e colaboradores), com um atraso de mais de uma década em relação a trabalhos com *Rhizobium* sp. NGR234 (Viprey *et al.*, 1998) e *B. japonicum* USDA110 (Gottfert *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2002). Apesar de diversos trabalhos com o T3SS em rizóbios já terem sido realizados algumas questões ainda permanecem sem respostas, como, por exemplo, qual o período da simbiose no qual o sistema está funcional, qual o “alvo” das proteínas efetoras na célula vegetal e, ainda, como ocorre a regulação da expressão dos genes do T3SS.

Em relação à regulação da expressão dos genes, uma proteína aparece como principal entre os reguladores do T3SS em rizóbios, a proteína TtsI. Esta Tese teve como objetivo o estudo desta proteína em *B. elkanii* SEMIA587. Os objetivos específicos incluíram a criação de uma linhagem mutante para o gene *ttsI*, com a qual testes de nodulação e secreção de proteínas foram realizados e o estudo da transcrição de regiões promotoras contendo o motivo de ligação desta proteína (*tts-box*) nas linhagens selvagem e mutante na presença de diferentes flavonoides. Com esses experimentos pôde-se entender um pouco mais a respeito da regulação realizada por esta proteína na ativação dos genes do T3SS em *B. elkanii* SEMIA587.

Trabalhos realizados com proteínas TtsI de diferentes rizóbios têm abordado os diferentes aspectos da regulação desta proteína e o envolvimento na ativação dos genes do T3SS (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; López-Baena *et al.*, 2008; Wassem *et al.*, 2008). Um dos primeiros e mais importantes achados relacionados com a TtsI foi a sequência consenso de ligação, *tts-box*, localizada nas regiões promotoras dos genes controlados por essa proteína (Krause *et al.*, 2002). Essa sequência se mostrou conservada nos diversos rizóbios estudados e, a partir disso, buscas nos genomas puderam encontrar esse elemento, identificando quais os genes poderiam ser controlados por essa proteína (Marie *et al.*, 2004; Süß *et al.*, 2006; Zehner *et al.*, 2008). Nesta Tese, o elemento *cis tts-*

*box* foi obtido através da amplificação de regiões promotoras de genes do T3SS (*ttsI* e *nopC*). Testes de expressão desses promotores após a indução por flavonoides demonstraram a capacidade de resposta aos indutores testados. Esses resultados estão de acordo com o que foi estudado em outros rizóbios (Krause *et al.*, 2002; López-Baena *et al.*, 2008; Wassem *et al.*, 2008; Zehner *et al.*, 2008). Porém, a inducibilidade do T3SS não foi observada em *B. elkanii* USDA61, em testes de secreção de proteínas (Okazaki *et al.*, 2009). Além de indução das regiões promotoras, testes de secreção de proteínas foram realizados e foi demonstrado, nessa Tese, que as proteínas secretadas (Nops) foram detectadas somente após a indução com o flavonoide genisteína.

A linhagem mutante obtida nesse trabalho permitiu estudos comparativos entre as bactérias, de forma a caracterizar parcialmente a função do gene *ttsI* em *B. elkanii* SEMIA587. Em relação à secreção de proteínas, a bactéria mutante foi incapaz de secretar as Nops testadas (NopA e NopL), mesmo após a indução com o flavonoide genisteína, nas mesmas condições utilizadas para a bactéria de tipo selvagem. A falta de Nops em mutantes para o gene *ttsI* também foi descrita em *S. fredii* HH103 (López-Baena *et al.*, 2008). Porém, apesar de aparentemente todo o T3SS estar comprometido no mutante aqui descrito, uma vez que este é deficiente em Nops, os resultados obtidos em testes de nodulação apresentaram um padrão de dependência do hospedeiro, como já foi descrito para o T3SS de outras bactérias. A bactéria mutante apresentou um fenótipo de diminuição no número de nódulos com uma das cultivares de soja testada (Peking), enquanto que para a outra cultivar testada (McCall), um resultado diferente foi obtido (fenótipo neutro). Esses resultados também estão de acordo com o que foi descrito para mutantes para o gene *ttsI* de outros rizóbios (Viprey *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2002; López-Baena *et al.*, 2008). As outras plantas testadas (*Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*) também apresentaram fenótipos neutros quando comparadas com a linhagem de tipo selvagem.

A linhagem mutante para o gene *ttsI* também apresentou resultados diferentes, em relação aos testes de transcrição, quando os vetores de fusão com o gene *gfp* foram utilizados nessa linhagem. Da mesma forma que na linhagem de tipo selvagem, as bactérias foram multiplicadas na presença de flavonoides e o nível de expressão da Gfp foi medida. Com a bactéria mutante não houve ativação das regiões promotoras, contendo o *tts-box*. Esse resultado era esperado, uma vez que se a bactéria não produz a proteína TtsI, a taxa de transcrição dos genes por ela controlados deve ser menor, já que, em outras bactérias, foi demonstrado que esta proteína se liga nas regiões que contém o chamado *tts-box* (Wassem *et al.*, 2008).

Ainda restam questões em relação à regulação do T3SS e da atividade da TtsI em *B. elkanii*, principalmente após a descoberta da sequência consenso *tts-box* na região promotora do gene *ttsI*. Nesta Tese foi demonstrado que essa região é ativa e responsiva a flavonoides, o que gera questões sobre a regulação da transcrição desse gene em *B. elkanii* SEMIA587. Nos demais rizóbios que possuem o T3SS, a região promotora do gene *ttsI* possui o elemento *cis nod-box*, e, dessa forma, foi visto que a regulação da transcrição desse gene é dependente de NodD1 e flavonoides (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004; Wassem *et al.*, 2008). Entretanto, um elemento *cis nod-box* não foi localizado na região promotora do gene *ttsI* de *B. elkanii* SEMIA587 e, levando-se em conta que em *B. japonicum* USDA110 ainda existe a regulação por NodW, é de se esperar que a regulação do T3SS em *B. elkanii* SEMIA587 possa ainda estar sofrendo uma influência de fatores ainda não descritos.

Com o término desta Tese, após quatro anos dedicados ao estudo da bactéria *B. elkanii* SEMIA587 em relação a sua interação com as plantas hospedeiras, o papel do T3SS, através do estudo da proteína reguladora da transcrição TtsI, ficou, de certa forma, um pouco mais conhecido para esta linhagem bacteriana. A bactéria induz o T3SS após o

reconhecimento da presença de flavonoides (no caso genisteína), secretando proteínas (Nops) que servem de sinalização para a interação com a planta hospedeira e para a formação do um *pilus* característico do sistema. Após a secreção das Nops, as bactérias entram nas chamadas brechas de infecção, que direcionam as bactérias ao nódulo que está sendo formado.

Para complementar o conhecimento adquirido nesta Tese ainda é necessária uma melhor caracterização genética da bactéria *B. elkanii*, uma vez que o conhecimento existente do genoma dessa espécie é bastante incompleto e sequer se sabe da presença de genes importantes como, por exemplo, *nodW* e *nodV*. Como complementação do estudo realizado, a utilização de um mutante para o gene *nodD1* poderia responder a questões como, por exemplo, se esse ativador (NodD1) estaria envolvido na ativação da transcrição do gene *ttsI*, como ocorre em outros rizóbios, juntamente com os flavonoides. Ainda, a busca de sequências à montante (*upstream*) do gene *ttsI* com características do motivo de ligação da proteína NodD1 (*nod-box*) para a caracterização da regulação dos genes nesta bactéria, se faz necessária. Ensaio de ligação da proteína TtsI de *B. elkanii* SEMIA587 nos *tts-box* obtidos nesta Tese serão necessários para a completa demonstração de atividade dessas regiões. Uma complementação da linhagem mutante (*ttsI*) com o gene *ttsI* selvagem também deve ser realizada.

Testes de nodulação com cultivares brasileiras de soja e ainda outras plantas leguminosas serão realizados, com o intuito de verificar a importância do T3SS e das proteínas secretadas, para outras leguminosas hospedeiras.

## 8 Referências

- ANDRADE DS, MURPHY PJ & GILLER KE (2002) Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biology and Biochemistry* 34:477-485.
- ARAÚJO LM, MONTEIRO RA, SOUZA EM, STEFFENS MBR, RIGO LU, PEDROSA FO and CHUBATSU LS (2004) GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 155: 491-495.
- ARNOLD W, RUMP A, KLIPP W, PRIEFER O and PÜHLER A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*. 203: (3) 715-738.
- AUSMEES N, KOBAYASHI H, DEAKIN, WJ, MARIE C, KRISHNAN, HB, BROUGHTON, WJ & PERRET, X (2004) Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Journal of Bacteriology* 186 (14): 4774-4780.
- BAIS HP, WEIR TL, PERRY LG, GILROY S & VIVANCO JM (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Reviews in Plant Biology* 57: 233-266.
- BARCELLOS FG, MENNA P, DA SILVA BATISTA JS & HUNGRIA M (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2635–2643.
- BARRIOS H, VALDERRAMA B & MORRET E (1999) Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research*. 27(22): 4305-4313.
- BARTSEV AV, BOUKLI NM, DEAKIN, WJ, STAEHELIN C & BROUGHTON WJ (2003) Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. *FEBS Letters* 554: 271-274.
- BARTSEV AV, DEAKIN WJ, BOUKLI NM, McALVIN CB, STACEY G, MALNOE P, BROUGHTON WJ & STAEHELIN C (2004) NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defence Reactions. *Plant Physiology* 134: 871-879.
- BENSON HP, BONCOMPAGNI E & GUERINOT ML (2005) An iron uptake operon

- required for proper nodule development in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18:950-959.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:874–880.
- BROUGHTON WJ (2003) Roses by Other Names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology* 185 (10): 2975-2979.
- BUTTNER D & BONAS U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion system. *Current Opinion in Microbiology* 9: 193-200.
- CARLSON RW, SANJUAN J, BHAT UR, GLUSHKA J, SPAINK HP, WIJFJES AHM, vanBRUSSEL AAN, STOKKERMANS TJW PETERS NK & STACEY G (1993) The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 18372-18381.
- CHEN X, FENG J, HOU B, LI F, LI Q & HONG G (2005) Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Research* 33 (8): 2540-2548.
- DAI WJ, ZENG Y, XIE ZP & STAEHELIN C (2008) Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Journal of Bacteriology* 190: 5101-5110.
- de LYRA MCCP, LÓPEZ-BAENA FJ, MADINABEITIA N, VINARDELL JM, ESPUNY MR, CUBO MT, BELLOGÍN RA, RUIZ-SAINZ JE & OLLERO FJ (2006). Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *International Microbiology* 9, 125–133.
- DEAKIN WJ, MARIE C, SAAD MM, KRISHNAN HB & BROUGHTON WJ (2005) NopA Is Associated with Cell Surface Appendages Produced by the Type III Secretion System of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18 (5): 499-507.
- DEAKIN WJ & BROUGHTON WJ (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* 7: 312-320.
- DEVINE TE & KUYKENDALL LD (1996) Host genetic control of symbiosis in soybean (*Glycine max* L.). *Plant and Soil* 186: 173-187.

- D'HAENZE W, GAO M, RYCKE R, MONTAGU MV, ENGLER G & HOLSTERS M (1998) Roles for Azorhizobial Nod Factors and Surface Polysaccharides in Intercellular Invasion and Nodule Penetration, Respectively. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11 (10): 999-1008.
- DIXON RA (1984) The genetic complexity of Nitrogen Fixation. *Journal of General Microbiology* 130: 2745-2755.
- DIXON RA (1998) The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in  $\alpha$ -Proteobacteria. *Archives in Microbiology* 169: 371-380.
- DIXON R & KAHN D (2004) Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nature Reviews in Microbiology* 2: 621-631.
- FELLAY R, HANIN M, MONTORZI G, FREY J, FREIBERG, C, GOLINOWSKI W, STAEHELIN C, BROUGHTON WJ & JABBOURI S (1998) *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Molecular Microbiology* 27:1039-1050.
- FIGURSKI DH & HELINSKI DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 76:1648-1652.
- FREIBERG C, FELLAY R, BAIROCH A, BROUGHTON WJ, ROSENTHAL A & PERRET X (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394-401.
- FREIRE JRJ (1992) Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO EJBN, TSAI SM & NEVES MCP (Ed.). *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Cap. 9. p.121-140.
- FU H, HARTMANN A, LOWERY RG, FITZMAURICE WP, ROBERTS GP & BURRIS RH (1989) Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology* 171: 4679-4685.
- GEURTS R & BISSELING T (2002) *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell (Supplement)*: S239-S240.
- GHOSH P (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (4): 771-795.
- GOPHNA U, RON EZ & GRAUR D (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312: 151-163.
- GOTTFERT M, GROB P & HENNECKE H (1990) Proposed regulatory pathway encoded



- by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. Proceedings of National Academy of Sciences USA 87: 2680-2684.
- GOTTFERT M, HOLZHAUSER D, BANI D, HENNECKE H (1992) Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Molecular Plant Microbe Interactions 5: 257-265.
- GOTTFERT M, ROTHLSBERGER S, KUNDIG C, BECK C, MARTY R & HENNECKE H (2001) Potential Symbiosis-Specific Genes Uncovered by Sequencing a 410-Kilobase DNA Region of the *Bradyrhizobium japonicum* Chromosome. Journal of Bacteriology 183 (4): 1405-1412.
- GRESSHOFF, PM (2003) Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. Genome Biology 4 (1) 201.
- GRUNWALD SK, RYLE MJ, LANZILOTTA WN & LUDDEN PW (2000) ADP-Ribosylation of Variants of *Azotobacter vinelandii* Dinitrogenase Reductase by *Rhodospirillum rubrum* Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase. Journal of Bacteriology. 182 (9): 2597-2603.
- HALBLEIB CM & LUDDEN PW (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. Journal of Nutrition 130: 1081-1084.
- HUECK CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (2): 379-433.
- HUERGO LF, ASSUMPÇÃO MC, SOUZA EM, STEFFENS MBR, YATES MG, CHUBATSU LS & PEDROSA FO (2004) Repressor Mutant Forms of the *Azospirillum brasilense* NtrC Protein. Applied and Environmental Microbiology 70 (10): 6320-6323.
- JONES KM, KOBAYASHI H, DAVIES BW, TAGA ME & WALKER GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature Reviews Microbiology 5: 619-633.
- KAMBARA K, ARDISSONE S, KOBAYASHI H, SAAD MM, SCHUMPP O, BROUGHTON WJ & DEAKIN WJ (2009) Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. Molecular Microbiology 71 (1): 92-106.
- KANEKO T, NAKAMURA Y, SATO S, MINAMISAWA K, UCHIUMI T, SASAMOTO S, WATANABE A, IDESAWA K, IRIGUCHI M, KAWASHIMA K, KOHARA M, MATSUMOTO M, SHIMPO S, TSURUOKA H, WADA T, YAMADA M & TABATA S (2002) Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Research 9: 189-197.
- KLOSE KE, WEISS DS & KUSTU S (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of

- nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartylphosphate and activates the protein. *Journal of Molecular Biology*. 232:67-78.
- KOBAYASHI H, NACIRI-GRAVEN Y, BROUGHTON WJ & PERRET X (2004) Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod* -box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology* 51 (2): 335-347.
- KRAUSE A, DOERFEL A & GOTTFERT M (2002) Mutational and Transcriptional Analysis of the Type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15 (12): 1228-1235.
- KRISHNAN HB, KUO C & PUEPPKE SG (1995) Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both *nodD1* and *nodD2*, and is dependent on the cultivar specificity locus, *noIXWBTUV*. *Microbiology* 141:2245-2251.
- KRISHNAN HB (2002) NoIX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a Type III Secreted Protein Involved in Host Range Determination, Is Localized in the Infection Threads of Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) Nodules. *Journal of Bacteriology* 184 (3): 831-839.
- KRISHNAN HB, LORIO J, KIM WS, JIANG G, KIM KY, DeBOER M & PUEPPKE SG (2003) Extracellular Proteins Involved in Soybean Cultivar-Specific Nodulation Are Associated with Pilus-Like Surface Appendages and Exported by a Type III Protein Secretion System in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16 (7): 617-625.
- KRISHNAN HB, KIM WS & SUN-HYUNG J. (2007) Calcium regulates the production of nodulation outer proteins (Nops) and precludes pili formation by *Sinorhizobium fredii* USDA257, a soybean symbiont. *FEMS Microbiology Letters* 271: 59-64.
- KUYKENDALL LD, SAXENA B, DEVINE TE & UDELL SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 501-505.
- LAHAYE T & BONAS U (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science* 6 (10): 479-485.
- LAFAY B & BURDON JJ (1998) Molecular Diversity of Rhizobia Occurring on Native Shrubby Legumes in Southeastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3989-3997.
- LAN C-Y & IGO MM (1998) Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *Journal of*

- Bacteriology 180:171-174.
- LANG K, LINDEMANN A, HAUSER F & GÖTTFERT M (2008) The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Genetics and Genomics* 279:203-211.
- LOH JT, GARCIA M & STACEY G (1997) NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 179: 3013-3020.
- LOH JT, STACEY MG, SADOWSKY MJ & STACEY G (1999) The *Bradyrhizobium japonicum* *nolA* Gene Encodes Three Functionally Distinct Proteins. *Journal of Bacteriology* 181 (5): 1544-1554.
- LOH JT & STACEY G (2001) Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Molecular Microbiology* 41 (6): 1357-1364.
- LOH JT & STACEY G (2003) Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: A unique integration of global regulatory circuits. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 10-17.
- LÓPEZ-BAENA FJ, VINARDELL JM, PÉREZ-MONTANO F, CRESPO-RIVAS JC, BELLOGÍN RA, ESPUNY MR & OLLERO FJ (2008) Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology* 154: 1825–1836.
- LÓPEZ-GARCÍA SL, VASQUÉS TEE, FAVELUKES G & LODEIRO AR (2002) Improved Soybean Root Association of N-Starved *Bradyrhizobium japonicum* *Journal of Bacteriology* 183 (24): 7241-7252.
- LORIO JC, KIM WS & KRISHNAN HB (2004). NopB, a soybean cultivar-specificity protein from *Sinorhizobium fredii* USDA257, is a type III secreted protein. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17, 1259–1268.
- LORIO JC, CHRONIS D & KRISHNAN HB (2006) y4xP, an Open Reading Frame Located in a Type III Protein Secretion System Locus of *Sinorhizobium fredii* USDA257 and USDA191, Encodes Cysteine Synthase. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19 (6): 635-643.
- MARIE C, BROUGHTON WJ & DEAKIN WJ (2001) *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology* 4: 336-342.
- MARIE C, DEAKIN WJ, VIPREY V, KOPCINSKA J, GOLINOWSKI W, KRISHNAN HB, PERRET X & BROUGHTON WJ (2003) Characterization of Nops, Nodulation Outer Proteins, Secreted Via the Type III Secretion System of NGR234. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16(9): 743-751.

- MARIE C, DEAKIN WJ, OJANEN-REHUS T, DIALLO E, REHUS B, BROUGHTON WJ & PERRET X (2004) TtsI, a Key Regulator of *Rhizobium* Species NGR234 Is Required for Type III-Dependent Protein Secretion and Synthesis of Rhamnose-Rich Polysaccharides. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17 (9): 958-966.
- MEINHARDT LW, KRISHAN HB, BALLATI PA & PUEPPKE SG (1993) Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Molecular Microbiology* 9: 17-29.
- MERGAERT P, MONTAGU VM & HOLSTERS M (1997) The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *FEBS Letters* 409:312-316.
- MERGAERT P, UCHIUMI T, ALUNNI B, EVANNO GI, CHERON A, CATRIC O, MAUSSET A, BARLOY-HUBLER F, GALIBERT F, KONDOROSI A & KONDOROSI E (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of National Academy of Sciences* 103 (13): 5230-5235.
- MERRICK MJ & EDWARDS RA (1995) Nitrogen control in Bacteria. *Microbiology Reviews*. 59(4): 604-622.
- MICHIELS JB, DOMBRECHT N, VERMEIREN C, XI E, LUYTEN & J VANDERLEYDEN (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology* 26:193-205.
- MILLER WG, LEVEAU JHJ & LINDOW SE (2000) Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13 (11): 1243-1250.
- MUDGETT MB (2005) New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants. *Annual Reviews in Plant Biology* 56: 509-531.
- MYLONA P, PAWLOWSKI & K BISSELING T (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* (7): 869-885.
- OKAZAKI S, ZEHNER S, HEMPEL J, LANG K & GOTTFERT M (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiology Letters* 295: 88-95.
- PETERS JW, FISCHER K & DEAN DR (1995) Nitrogenase Structure and Function: A Biochemical-Genetic Perspective. *Annual Reviews in Microbiology* 49: 335-366.
- PERRET X, STAEHELIN C & BROUGHTON WJ (2000) Molecular Basis of Symbiotic

- Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (1): 180-201.
- PRENTKI P & KIRSCH HM (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29:303–313.
- PUEPPKE SG, BOLANOS-VASQUEZ MC, WERNER D, BEC-FERTÉ M-P, PROMÉ JC & KRISHNAN HB (1998) Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perceptions as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiology* 177: 599-608.
- PUEPPKE SG & BROUGHTON WJ (1999) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12 (4): 293-318.
- RANGARAJ P, RÜTTMANN-JOHNSON C, SHAN VK & LUDDEN PW (2001) Accumulation of <sup>55</sup>Fe-labeled Precursors of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase NifH and NifX of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* 276 (19): 15968-15974.
- RELIC B, PERRET X, ESTRADA-GARCIA MT, KOPCINSKA J, GOLINOWSKI W, KRISHNAN HB, PUEPPKE SG & BROUGHTON WJ (1994) Nod Factors of *Rhizobium* are a Key to the Legume Doors. *Molecular Microbiology* 13 (1): 171-178.
- RODRIGUES JA, LÓPEZ-BAENA FJ, OLLERO FJ, VINARDELL JM, ESPUNY MR, BELLOGN RA, RUIZ-SAINZ JE, THOMAS JR, SUMPTON D, AULT J, & THOMAS-OATES J (2007) NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *Journal of Proteome Research* 6: 1029–1037.
- RUAN X & PETERS NK (1992) Isolation and characterization of rhizobitoxine mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 174: 3467-3473.
- RUMJANEK NG, DOBERT RC, VanBERKUM P & TRIPLETT EW (1993) Common Soybean Inoculants Strains in Brazil are Members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (12): 4371-4373.
- SAAD MM, KOBAYASHI H, MARIE C, BROWN IR, MANSFIELD JW, BROUGHTON WJ & DEAKIN WJ (2005) NopB, a Type III Secreted Protein of *Rhizobium* sp. Strain NGR234, Is Associated with Pilus-Like Surface Appendages. *Journal of Bacteriology* 187 (3): 1173-1181.
- SAIER MH, Jr (2004) Evolution of the bacterial type III protein secretion systems. *Trends in Microbiology* 12:113-115.
- SAMBROOK J & RUSSEL DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed.

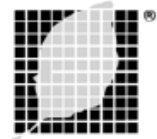
- Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- SANJUAN J, GROB P, GOTTFERT M, HENNECKE H & STACEY G (1994) NodW is essential for the full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7: 364-369.
- SESSITSCH A, GYAMFI S, STRALIS-PAVESE N, WEILHARTER A & PFEIFER U (2002) RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods* 51 (2): 171-179.
- SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G & PÜHLER A (1994) Small mobilizable multipurpose 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.
- SKORPIL P, SAAD MM, BOUKLI NM, KOBAYASHI H, ARES-ORPEL F, BROUGHTON WJ & DEAKIN WJ (2005) NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Molecular Microbiology* 57: 1304-1317.
- SOMASEGARAM P & HOBEN JH (1994) Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology. Springer-Verlag, New York. 450 p.
- STACEY G (1995) *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS Microbiology Letters*: 127: 1-9.
- STOKKERMANS TJW, SANJUAN J, RUAN X, STACEY G & PETERS NK (1992) *Bradyrhizobium japonicum* rhizobitoxine mutants with altered hostrange on *Rj4* soybeans. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 5: 504-512.
- SUGAWARA M, OKAZAKI S, NUKUI N, EZURA H, MITSUI H & MINAMISAWA K (2006) Rhizobitoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnology Advances* 24: 382-388.
- SÜß C, HEMPEL J, ZEHNER S, KRAUSE A, PATSCHKOWSKI T & GOTTFERT M (2006) Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Biotechnology* 126: 69-77.
- SWANSON JA, MULLIGAN JT & LONG SR (1993) Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics* 134: 435-444.
- TAMPAKAKI AP, FADOULOGLOU VE, GAZI AD, PANOPOULOS NJ & KOKKINIDIS M (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular*

- Microbiology 6 (9): 805-816.
- TAN G, GAO Y, SHI M, ZHANG X, HE S, CHEN Z & AN C (2005) SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research* 33 (13): e122.
- VIPREY V, GRECO AD, GOLINOWSKI W, BROUGHTON WJ & PERRET X (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology* 28 (6): 1381-1389.
- WASSEM R, KOBAYASHI H, KAMBARA K, Le QUÉRÉ AJL, WALKER GC, BROUGHTON WJ & DEAKIN WJ (2008) TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts*-boxes. *Molecular Microbiology* 68: 736-748.
- YUHASHI K, ICHIKAWA N, EZURA H, AKAO S, MINAKAWA Y, NUKUI N, YASUTA T & MINAMISAWA K (2000) Rhizobitoxine Production by *Bradyrhizobium elkanii* Enhances Nodulation and Competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2658-2663.
- ZEHNER S, SCHÖBER G, WENZEL M, LANG K & GOTTFERT M (2008) Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 1087–1093.
- ZHANG Y, BURRIS RH, LUDDEN PW & ROBERTS GP (1997) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 152: 195-204.

## 9 *Anexo*



# Molecular Plant-Microbe Interactions



## The roles of flavonoids and the transcriptional regulator, TtsI, in the activation of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*

Journal:	<i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Campos, Samanta; UFRGS, Genetica Deakin, William; Université de Genève, Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures (LBMPS) Broughton, Bill; University of Geneva, Plant Biology Department; Université de Genève, Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures (LBMPS) Passaglia, Luciane Maria; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetica
Area That Best Describes Your Manuscript:	Bacteria-plant symbiosis, molecular signaling < Bacteria-plant symbiosis, Rhizobium-legume symbiosis < Bacteria-plant symbiosis



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1                   **The roles of flavonoids and the transcriptional regulator, TtsI, in the activation**  
2                   **of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii***

5 Samanta Bolzan de Campos,<sup>1</sup> William J. Deakin,<sup>2</sup> William J. Broughton,<sup>2</sup> and Luciane M.  
6 P. Passaglia<sup>1,\*</sup>

9 <sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de  
10 Genética, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, CEP 91501-970, Porto Alegre,  
11 RS, Brazil; <sup>2</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures (LBMPS),  
12 Département de Biologie Végétale, Sciences III, 30 Quai Ernest-Ansermet, University of  
13 Geneva, CH-1211 Geneva 4, Switzerland.

16 \*Correspondence author: Dr. Luciane M. P. Passaglia, Universidade Federal do Rio Grande  
17 do Sul, Departamento de Genética, Av. Bento Gonçalves, 9500, C. P. 15053, Prédio 43312,  
18 sala 207b, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil. e-mail: [lpassaglia@terra.com.br](mailto:lpassaglia@terra.com.br).

20 Additional keywords: *nod*-box element; nodulation outer proteins; nodulation test; soybean,  
21 *tts*-box element; two-component regulatory system.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 1 ABSTRACT

2 *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 is a symbiotic nitrogen-fixing bacterium that induces  
3 nodule formation in soybean and is largely used in Brazilian commercial inoculants.  
4 Among the molecular signals that are important to the interaction between the symbiotic  
5 bacteria and plants are Nod factors, secreted by the bacterium in response to flavonoid  
6 compounds, released by plant roots. Besides Nod factors other rhizobial signals are  
7 produced in response to flavonoids, such as proteins secreted by a type III secretion system  
8 (T3SS). Rhizobial T3SS are activated by the transcription regulator TtsI. TtsI has been  
9 shown to bind to sequences present in the promoter regions of some of the T3SS genes via  
10 a conserved sequence called the *tts*-box. To study the role of the T3SS of *B. elkanii*  
11 SEMIA587, *ttsI* was mutated. Protein secretion and flavonoid induction analysis, as well as  
12 nodulation tests were performed with the wild type and mutant strains. The results obtained  
13 showed that *B. elkanii* SEMIA587 secretes at least two proteins through its T3SS (NopA  
14 and NopL), after genistein induction, while the *ttsI* mutant strain was unable to secrete  
15 these Nops. Unusually for rhizobia, the promoter region of *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene  
16 contains a *tts*-box, which is responsive to flavonoid induction and to which TtsI can bind.  
17 Nodulation tests performed with three different leguminous plants showed that *B. elkanii*  
18 SEMIA587 T3SS displayed host-dependent characteristics; in particular nodulation of two  
19 soybean cultivars, Peking and EMBRAPA 48, was more efficient if the *B. elkanii* T3SS  
20 was functional.

21

## 22 INTRODUCTION

23 Type 3 secretion systems (T3SS) are specialized machines for protein secretion that  
24 are used by many Gram-negative bacterial strains. This apparatus is formed by about 20

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 proteins, many of which are homologous to proteins of the flagellum's biosynthesis. When  
2 not used for flagella assembly a T3SS functions to deliver proteins (called effectors)  
3 directly into the cytosol of eukaryotic cells (Pallen et al. 2003). T3SSs were first thought to  
4 be exclusive of pathogenic bacteria (Hueck, 1998), but after the sequencing of the  
5 symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234 homologous sequences to genes that encode a  
6 T3SS and possible effectors were found (Freiberg et al. 1997). Later it was shown that the  
7 system in this bacterium was complete and functional (Viprey et al. 1998), and that it was  
8 involved in the host range nodulation in *Rhizobium* sp. NGR234 as well as in  
9 *Sinorhizobium fredii* USDA257 (Krishnan et al. 1995; Viprey et al. 1998). The proteins  
10 secreted by T3SS of rhizobia are termed nodulation outer proteins (Nops) and can have  
11 different roles, depending on the host plant. Some effectors Nops can enhance nodulation in  
12 specific leguminous plants whilst in others Nops may be recognized as virulence factors,  
13 decreasing the nodule formation (Viprey et al. 1998; Krishnan et al. 2003; Bartsev et al.  
14 2003; Bartsev et al. 2004; Skorpil et al. 2005).

15 In rhizobia the T3SS is activated by the NodD1 protein in a flavonoid dependent  
16 manner. NodD1 activates the expression of the transcriptional activator TtsI by binding to  
17 the *nod*-box in the promoter region of its gene (*ttsI*). A *nod*-box element has been identified  
18 in the promoters of all *ttsI* genes studied (Viprey et al. 1998; Krause et al. 2002; Marie et al.  
19 2003; Marie et al. 2004; López-Baena et al. 2008; Wassem et al. 2008). Whereas no *nod*-  
20 box sequences are found in the promoter regions of other genes encoding the system,  
21 instead a different *cis* element was identified and named by Krause et al. (2002) as a *tts*-  
22 box. TtsI activates the transcription of the other T3SS related genes, by binding to the  
23 consensus *tts*-box sequence, nnntcGTCA GcttntcGaaAGctagnccnntannnnn (Krause et al.  
24 2002; Marie et al. 2004; López-Baena et al. 2008; Wassem et al. 2008; Zehner et al. 2008).

Campos, S. B. MPMI 3

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 Copies of this consensus sequence have been found in the promoter regions of the T3SS  
2 genes of *Rhizobium* sp. NGR234 (Marie et al. 2004; Wassem et al. 2008), *B. japonicum*  
3 USDA110 (Krause et al. 2002; Zehner et al. 2008), *S. fredii* HH103 and *S. fredii* USDA257  
4 (López-Baena et al. 2008; Krause et al. 2002).

5 TtsI has homology to the DNA binding response regulators of two-component  
6 regulatory systems (Viprey et al. 1998; Marie et al. 2004; Wassem et al. 2008). Such  
7 regulators are usually activated by their kinase partner sensor that transfers a phosphoryl  
8 group to an aspartate residue in the regulator, leading to a conformational change that  
9 activates this protein. Once phosphorylated the regulator protein binds to *cis* elements  
10 located in the promoter region of genes that are required to process the environmental  
11 signal that is sensed by the sensor partner. TtsI, however, has a glutamate residue instead of  
12 the conserved aspartate. It has already been shown that this type of substitution leads to a  
13 constitutive activation of the regulator protein, without the need of its partner sensor (Lan  
14 and Igo 1998). It has thus been proposed that TtsI could act as a transcriptional activator  
15 independently of phosphorylation by the kinase partner sensor (Marie et al. 2004; Wassem  
16 et al. 2008). Thus, transcription of T3SS genes would be dependent on the NodD1  
17 activation of the *ttsI* gene, in the presence of the specific flavonoid compound released by  
18 the host plant (Kobayashi et al. 2004; Marie et al. 2004; Wassem et al. 2008).

19 Nodulation of soybean can be induced by various rhizobial strains possessing T3SS.  
20 Mutation of the T3SS of *B. japonicum* USDA110 led to a delay in nodule formation by  
21 *Glycine max* cultivar Williams (Krause et al. 2002). Similarly a functional T3SS in *S. fredii*  
22 HH103 enhanced nodulation of various soybean cultivars (López-Baena et al. 2008). The  
23 T3SS of *S. fredii* USDA257 has varying effects on nodulation of soybean cultivars. On

1 cultivar Peking an active T3SS improves nodulation, whereas the T3SS must be mutated to  
2 allow nodulation of cultivar McCall (Meinhardt et al. 1993).

3 In Brazil, *Bradyrhizobium elkanii* is successfully used in the formulation of  
4 commercial inoculants to increase soybean yields and, together with *B. japonicum*, it fully  
5 supplies the plant nitrogen demands. Nowadays, only four *B. japonicum* and *B. elkanii*  
6 strains are used in the formulation of Brazilian's commercial inoculants and they have  
7 resulted in an established population in most soils cropped with soybean (Ferreira et al.  
8 2000). Of those recommended strains, SEMIA587 and SEMIA5019 belonged to the *B.*  
9 *elkanii* species, while SEMIA5080 and SEMIA5079 belonged to the *B. japonicum* species  
10 (Rumjanek et al. 1993).

11 Genomic hybridizations performed by Viprey et al (1998) have shown that T3SS  
12 homologues were present in *B. elkanii* USDA76, however, a 47.1 kb sequence of T3SS  
13 cluster from *B. elkanii* USDA61 was only recently obtained by Okazaki et al (2009).  
14 Creation of T3SS mutants of this strain showed that it had a host-dependent nodulation  
15 phenotype – a functional T3SS improved nodulation of cultivar Clark but blocked  
16 nodulation of cultivar Hill (Okazaki et al. 2009). Characterization of the DNA sequence in  
17 the T3SS locus of *B. elkanii* USDA61 showed that it possessed *tsI* (preceded by a *nod* box)  
18 as well as numerous *ts* boxes upstream of key genes encoding T3SS components. Despite  
19 containing all the elements required for flavonoid-based induction of protein secretion, this  
20 was not observed and the presence of flavonoids in the growth medium had no effect on  
21 protein secretion (Okazaki et al. 2009).

22 In this work we investigated the role of the T3SS in the agronomically important  
23 Brazilian (soybean) inoculant *B. elkanii* SEMIA587. Identification of *tsI* and other T3SS-  
24 encoding genes permitted the creation of T3SS mutant strains. Their effects on nodulation

1 of soybean cultivars (and other legumes) known to differentially respond to rhizobial T3SS  
2 as well as a Brazilian soybean cultivar was assessed. Characterization of TtsI of *B. elkanii*  
3 SEMIA587 showed it (and hence the T3SS) to be induced by flavonoids produced by  
4 soybean. The identification of a functional *tts* box upstream of *ttsI* revealed an unusual  
5 regulatory mechanism not present in other T3SS-possessing rhizobia.

## 7 RESULTS

### 8 Cloning of DNA sequences from the T3SS of *B. elkanii* SEMIA587

9 A PCR-based approach was used to amplify the coding sequence of *ttsI* gene from  
10 *B. elkanii* SEMIA587 genomic DNA. The DNA sequences of all rhizobial *ttsI* genes were  
11 aligned and used to design specific primers for PCR. A product of the expected size  
12 (approximately 350 bp) was generated, cloned and verified to be highly homologous to *ttsI*  
13 by DNA sequencing (data not shown). The *ttsI* fragment was used to create a *ttsI* mutant by  
14 disrupting the gene with an omega ( $\Omega$ ) cassette (see Material and Methods for more  
15 details). The phenotype of the mutant was subsequently characterized (see below).

16 The *ttsI* promoter region was accessed by chromosome walking, using the Site-  
17 Finding-PCR approach (Tan et al. 2005). By sequence analysis we were able to identify a  
18 potential *tts*-box *cis* element 45 bp upstream of the beginning of the *ttsI* coding region (Fig.  
19 1). No *nod*-box motif was detected, but as the length of the sequence obtained was only 200  
20 bp, it is possible that a *nod*-box motif could be present distally in the promoter region of  
21 this gene, as for other rhizobial species (Krause et al. 2002; López-Baena et al. 2008). The  
22 presence of the *tts*-box motif in the promoter region of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene  
23 was unexpected, since this element was not identified in others *ttsI* promoters regions  
24 already described.

1  
2  
3  
4 1 A second *tts*-box was also isolated, from the promoter of a gene shown in other  
5  
6 2 rhizobia to be under TtsI/*tts*-box control (Wassem et al 2008). The *nopC* *tts*-box (59 bp  
7  
8 3 upstream of the beginning of the *nopC* coding region) was obtained by PCR, using primers  
9  
10 4 designed from the corresponding gene sequences of *B. elkanii* USDA61 (see Material and  
11  
12 5 Methods for more details). DNA sequence analysis confirmed the correct amplification of a  
13  
14 6 *tts*-box (Fig. 1).  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 **The flavonoids genistein and daidzein were able to induce GFP expression from both** 21 ***nopC* and *ttsI* *tts*-box elements**

22  
23  
24 10 The promoter sequences of both *nopC* and *ttsI* genes were subcloned into pPROBE  
25  
26 11 NT vector (Miller et al. 2000), and conjugated into *B. elkanii* SEMIA587 wild type and *ttsI*  
27  
28 12 mutant strains, in order to test their transcription activation activities in the presence or  
29  
30 13 absence of flavonoids. The flavonoids used to induce gene expression were genistein and  
31  
32 14 daidzein, which are flavonoids known to be released by soybean. After 24 h of induction,  
33  
34 15 *B. elkanii* SEMIA587 wild type strain showed an elevated GFP expression only in the  
35  
36 16 presence of the flavonoids for both *tts*-box promoter sequences. *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*  
37  
38 17 mutant strain, however, did not display any GFP activity, even after the induction with the  
39  
40 18 same flavonoids (Fig. 2).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

### 48 **Electrophoretic Mobility Shift Assay**

49  
50 21 As the presence of a *tts*-box in the upstream region of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*  
51  
52 22 gene was unusual we decide to verify its functionality also through the binding of the TtsI  
53  
54 23 protein in this sequence. To achieve this result an Electrophoretic Mobility Shift Assay  
55  
56 24 (EMSA) was performed using the *B. elkanii* TtsI protein present in the crude extract of *E.*  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4 1 *coli* BL21 (carrying the *ttsI* gene cloned into a pET-23a expression vector) and the *tts*-box  
5  
6 2 of the *ttsI* gene identified in this work. Figure 3 shows that the DNA fragment containing  
7  
8 3 the *tts*-box from the promoter region of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene had its  
9  
10 4 migration rate delayed when it was incubated with two different amounts of the extract  
11  
12 5 containing the TtsI protein (Fig. 3, lanes 2 and 3), while when this same fragment was  
13  
14 6 incubated with a crude extract of *E. coli* BL21 carrying the empty vector no difference in  
15  
16 7 its migration rate was observed (Fig. 3, lane 4). Therefore TtsI is able to recognize and bind  
17  
18 8 to the *ttsI* promoter sequence, most likely via the *tts*-box.  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 **Inactivation of *ttsI* abolishes Nops secretion**

25  
26  
27 11 The results of the GFP activity experiments showed that both daidzein and genistein  
28  
29 12 could activate T3SS genes and that TtsI was required, since no induction was seen in the  
30  
31 13 *ttsI* mutant. We thus tested whether these flavonoids could cause T3SS-dependent protein  
32  
33 14 secretion by *B. elkanii* SEMIA587 and whether this was absent in the *B. elkanii* SEMIA587  
34  
35 15 *ttsI*. Cultures of both strains were induced with genistein and secreted proteins isolated (see  
36  
37 16 Materials and Methods). The secreted protein extractions were separated via SDS-PAGE  
38  
39 17 but silver-staining of these gels gave inconclusive results. Identical gels were then blotted  
40  
41 18 onto membranes and tested against antibodies raised against known T3SS-secreted  
42  
43 19 proteins, NopA and NopL of *Rhizobium* sp. NGR234. Secretion of these two Nops was  
44  
45 20 observed by the wild type strain in the presence of genistein, but the *ttsI* mutant failed to  
46  
47 21 secrete both Nops, even after flavonoid induction (Fig. 4).  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

#### 55 **Nodulation tests showed a *B. elkanii* host-dependent phenotype**

1  
2  
3  
4 1 As previously demonstrated the T3SS of several rhizobial strains displayed a host-  
5  
6 2 dependent phenotype (Viprey et al, 1998; Krause et al. 2002; Okazaki et al. 2009). Since  
7  
8 3 the *ttsI* mutant of *B. elkanii* SEMIA587 was blocked for T3SS activity, comparison of this  
9  
10 4 mutant and wild type in nodulation tests permitted analysis of the role of the *B. elkanii*  
11  
12 5 SEMIA587 T3SS in symbiosis. Three soybean cultivars, McCall, Peking, and EMBRAPA  
13  
14 6 48, as well as *Macropodium atropurpureum* (siratro) and *Vigna unguiculata* (cowpea) were  
15  
16 7 tested. Soybean cultivars McCall and Peking were used since it was shown that they have  
17  
18 8 different response concerning to the *Sinorhizobium fredii* USDA257 T3SS (Meinhardt et al.  
19  
20 9 1993). EMBRAPA 48 is a modern commercial soybean cultivar extensively used by  
21  
22 10 Brazilian soybean producers. Siratro and cowpea were used due to observed effects of the  
23  
24 11 *B. japonicum* USDA110 T3SS on these legumes (Krause et al., 2002).

25  
26  
27  
28  
29 12 Nodule numbers formed were assessed 14 and 28 days after plant inoculation with  
30  
31 13 the wild type and *ttsI* mutant strains (Fig. 5). For the soybean cultivars Peking and  
32  
33 14 EMBRAPA 48, higher nodule numbers were observed when these plants were inoculated  
34  
35 15 with the wild type strain relative to the *ttsI* mutant. No significant differences in nodule  
36  
37 16 number were observed with the soybean cultivar McCall and siratro. With cowpea  
38  
39 17 however, although no differences were observed 14 days post inoculation, by 28 days the  
40  
41 18 wild-type had induced significantly more nodules (Fig. 5).  
42  
43  
44  
45

46 19

47  
48  
49 20 **DISCUSSION**

50  
51 21 T3SS have been characterized from several rhizobial species and have been shown  
52  
53 22 to be important determinants of host range. These T3SS are functional and capable of  
54  
55 23 secreting numerous Nops (Deakin and Broughton, 2009). The identification of T3SSs  
56  
57 24 within *B. elkanii* species has led to the investigation of their effects in the interaction of this  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 1 key inoculant with soybean and other leguminous plants. The sequencing of the *tts* cluster  
5  
6 2 of *B. elkanii* USDA61 showed it possesses many of the characteristics of other rhizobial  
7  
8 3 T3SSs (Okazaki et al. 2009).

9  
10 4 Generally rhizobial T3SS are controlled by NodD1 and activated upon flavonoid  
11  
12 5 perception (Kobayashi et al. 2004; Marie et al. 2004; Wassem et al. 2008). NodD1 induces  
13  
14 6 the T3SS-specific regulator, *ttsI*, via a *nod*-box in the promoter of *ttsI* (Viprey et al. 1998;  
15  
16 7 Krause et al. 2002; Marie et al. 2004; López-Baena et al. 2008; Wassem et al. 2008). TtsI is  
17  
18 8 able to activate other T3SS-related genes, as the promoters of *tts* genes share a common *cis*  
19  
20 9 element, the *tts*-box, to which TtsI binds (Krause et al. 2002). This element is conserved  
21  
22 10 amongst all the T3SS-containing rhizobia (Marie et al. 2004; López-Baena et al. 2008;  
23  
24 11 Wassem et al. 2008; Okazaki et al. 2009; Zehner et al. 2008). Analysis of the DNA  
25  
26 12 sequence of the T3SS of *B. elkanii* USDA61 suggested a similar pattern of regulation, as  
27  
28 13 *ttsI* was preceded by a *nod* box and other T3SS genes contained *tts* boxes in their  
29  
30 14 promoters. No flavonoid activation was observed, however (Okazaki et al. 2009).

31  
32  
33  
34  
35  
36 15 In this work we characterised the regulation of the T3SS of another *B. elkanii* strain,  
37  
38 16 SEMIA587. Sequences corresponding to *ttsI* and *tts* box-containing promoters were  
39  
40 17 identified and used to create a *ttsI* mutant and reporter gene fusions, respectively. The two  
41  
42 18 *tts* boxes, in the *ttsI* and *nopC* promoter regions, were both activated after 24 hours of  
43  
44 19 induction with genistein and daidzein, both flavonoids known to be released by soybean.  
45  
46 20 Furthermore this activation required the presence of a functional *ttsI* gene, since no  
47  
48 21 induction was seen when using a *ttsI* mutant. Thus the T3SS of *B. elkanii* SEMIA587 can  
49  
50 22 be induced by soybean-derived flavonoids, and appears to follow the standard rhizobial  
51  
52 23 mechanism, i.e. TtsI controlling *tts* box-containing promoters.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 1 The promoter region of *ttsI* from *B. elkanii* SEMIA587 is unusual, however, as it  
5  
6 2 contains a *tts* box. A fragment of the promoter sequence carrying this *tts* box was shown to  
7  
8 3 be active (see above) and thus we characterised this *tts* box further. An electrophoretic  
9  
10 4 mobility shift assay was performed, and showed that TtsI was able to bind to this *tts*-box.  
11  
12 5 One interpretation of the presence of a functional *tts* box upstream of *ttsI* would be to  
13  
14 6 reinforce the activation of *ttsI* transcription after flavonoid induction. Such a potential  
15  
16 7 positive feedback loop implies that in *B. elkanii* SEMIA587 the regulation of the genes of  
17  
18 8 the T3SS is markedly different from the other T3SS-possessing rhizobia. Attempts to  
19  
20 9 isolate extended sequences upstream of *ttsI* were unsuccessful and so at this point we  
21  
22 10 cannot know whether there is also a *nod* box (as for all other *ttsI* promoters) that might  
23  
24 11 initiate *ttsI* transcription (via NodD1 binding).  
25  
26  
27  
28

29  
30 12 We then performed a protein secretion assay with *B. elkanii* SEMIA587 wild type  
31  
32 13 and *ttsI* mutant strains in the presence of genistein. Protein secretion was impaired in the  
33  
34 14 *ttsI* mutant strain, for both Nops tested (NopA and NopL), while the wild type strain was  
35  
36 15 able to secrete both proteins, but only in the presence of the flavonoid. Similar results were  
37  
38 16 obtained when a *S. fredii* HH103 *ttsI* mutant strain was tested for Nop secretion (López-  
39  
40 17 Baena et al. 2008). Therefore, inactivation of the *ttsI* gene blocks Nop secretion in these  
41  
42 18 bacteria.  
43  
44

45  
46 19 Okazaki and colleagues (2009) did not find any difference in protein secretion when  
47  
48 20 they analysed the USDA61 strain of *B. elkanii* in the presence or absence of the same  
49  
50 21 flavonoid used in our work (genistein). Nops could only be identified from *B. elkanii*  
51  
52 22 USDA61 when comparisons were made between the wild type strain and a mutant in a  
53  
54 23 T3SS gene (*rhcJ*) which encodes an essential structural component of the machinery. The  
55  
56 24 discrepancy between the results obtained by Okazaki and colleagues (2009) and this work  
57  
58  
59  
60

Campos, S. B. MPMI 11

1 could be due to the culture medium used in both experiments. While in the present work  
2 RMS medium was used, Okazaki and colleagues (2009) used arabinose gluconate medium  
3 (Sadowsky et al. 1987). It has been shown that Nop secretion can be influenced by some  
4 compounds of the culture medium. For example, Krishnan and colleagues (2007) have  
5 shown that calcium prevents the accumulation of NopB and NopA, and drastically reduces  
6 that of NopX and NopL in *S. fredii* USDA257. It would be interesting to verify if *B. elkanii*  
7 USDA61 secretes NopA and NopL proteins when it is cultured in RMS medium, and  
8 whether the addition of flavonoids has any effect.

9 Nodulation tests assay were performed with *B. elkanii* SEMIA587 and a derivative  
10 *tts* mutant strain on three soybean cultivars (EMBRAPA 48, McCall and Peking), as well as  
11 *Macropitium atropurpureum* and *Vigna unguiculata*. Characterisation of the resulting  
12 plants showed that the number of nodules present by soybean cultivars EMBRAPA 48 and  
13 Peking was severally affected when the *ttsI* gene was inactive. At 14 dpi, there were  
14 significantly fewer nodules on these two plants when they were inoculated with the mutant  
15 strain comparing with plants inoculated with the wild type bacterium. Nodule formation on  
16 cultivar Peking is thus enhanced by the presence of an active T3SS in *B. elkanii* SEMIA587  
17 as well as *S. fredii* strains USDA257 and HH103. The number of nodules formed by  
18 cowpea was significantly higher when plants were inoculated with the wild type strain only  
19 after 28 days; there was no difference after 14 days. Nodulation tests performed with *B.*  
20 *japonicum* USDA110 *ttsI* mutant strain and soybean have shown that there was a  
21 statistically significant difference in the number of nodules 10 days after inoculation, but  
22 this phenotype was no longer significant after 20 days of inoculation (Krause et al. 2002).  
23 Although there were no obvious effects of the *B. elkanii* SEMIA587 T3SS on McCall  
24 (unlike *S. fredii* USDA257) and siratro, as for other T3SS-utilising rhizobia, on some

Campos, S. B. MPMI 12

1  
2  
3 1 legumes the T3SS of *B. elkanii* SEMIA587 can be responsible for an increase in the  
4  
5 2 number (and the speed of formation) of nodules. Despite the absence of flavonoid induction  
6  
7 3 of the T3SS, a T3SS host-dependent phenotype was also observed with *B. elkanii* USDA61  
8  
9 4 and derivative *rhcC2* and *rhcJ* mutants (Okazaki et al. 2009), where nodule formation was  
10  
11 5 different according to the cultivar of soybean (Hill or Clark in this case) or *Vigna radiata*  
12  
13 6 (CN36 or KPS1). With *M. atropurpureum*, the T3SS mutant strains induced fewer but  
14  
15 7 larger nodules than the wild type strain (Okazaki et al. 2009).

16  
17  
18  
19 8 In conclusion, our work demonstrates the importance of the T3SS of *B. elkanii*  
20  
21 9 SEMIA587 in the establishment of symbiosis with legumes. As for *B. elkanii* USDA61, the  
22  
23 10 transcriptional mechanisms for the activation of the T3SS differ from the rhizobial  
24  
25 11 paradigm. In USDA61 no flavonoid induction is observed, whereas for SEMIA587 the  
26  
27 12 potential for a flavonoid-induced positive feedback activation of the T3SS exists. *B. elkanii*  
28  
29 13 SEMIA587 is an important inoculant for the Brazilian soybean crop and we demonstrate  
30  
31 14 that its T3SS has a positive role in the formation of nodules on one crop cultivar of soy.  
32  
33 15 Future work will determine whether nodulation of other Brazilian soybean varieties is  
34  
35 16 similarly improved by the T3SS of *B. elkanii* SEMIA587, which rhizobial effectors are  
36  
37 17 responsible for the improvement and whether there is continual production of these  
38  
39 18 effectors (via the positive feedback activation of the *B. elkanii* SEMIA587 T3SS).  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 19

## 47 20 MATERIAL AND METHODS

### 48 21 Bacterial cultures and growth conditions

49  
50  
51 22 *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 and its derivatives were grown in YEM (yeast  
52  
53 23 extract and mannitol) (Vincent 1970) and RMS (*Rhizobium* minimal medium containing  
54  
55 24 succinate as the carbon source, Broughton et al. 1986) media at 28°C. *Escherichia coli*  
56  
57  
58  
59  
60

1 strains DH5 $\alpha$  and XL1-Blue were grown in Luria Bertani (LB) broth at 37°C (Sambrook  
2 and Russel 2001). Antibiotics were added to the media at the following final concentration:  
3 tetracycline, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; kanamycin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; and spectinomycin, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Where  
4 indicated, cultures were induced with genistein or daidzein at a final concentration of  $10^{-6}$   
5 M. As control, cultures were treated with the corresponding amount of methanol, which  
6 was used as the solvent for these flavonoids.

#### 7 8 ***B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* mutant construction**

9 Based on rhizobial *ttsI* sequences available on GenBank database, specific primers  
10 (*ttsI* FOR: TCTGCCCGATGGAGACGGCTT and *ttsI* REV:  
11 TGCGCAGGCGATAGATCCCGA) were designed and used to amplify an internal  
12 fragment of *ttsI* gene using *B. elkanii* SEMIA587 genomic DNA as template. PCR  
13 reactions were performed in a 25- $\mu\text{l}$  volume, containing 50 ng of DNA template, 1 U of  
14 *Taq* DNA polymerase (Life Technologies), 1 X *Taq* DNA polymerase reaction buffer, 1.5  
15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM dNTPs (Life Technologies) and 10  $\mu\text{Mol}$  of each primer.  
16 Amplification was carried out as follows: one initial denaturation step at 94°C for 5 min, 30  
17 cycles of denaturation 45 s at 94°C, annealing for 45 s at 52°C, and extension for 45 s at  
18 72°C, and one final extension step for 5 min at 72°C. Reactions were performed in a PCR  
19 Express Temperature Cycling System (Thermo Hybaid) and the fragments were visualized  
20 after electrophoresis at 80 V for 1 h on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.  
21 A molecular size marker (1 Kb plus DNA ladder, Gibco BRL) was run in all gels. The  
22 amplified fragment (364 bp) was cloned into pGEM T-easy vector (Promega) and totally  
23 sequenced in both the forward and reverse directions with M13 universal primers in the  
24 ACTGene Laboratory (Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, Brazil) using the automatic

Campos, S. B. MPMI 14

1  
2  
3 1 sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequence was  
4  
5 2 checked and compared to those from the GenBank database, using the program BLAST  
6  
7 3 (NCBI BLAST<sup>R</sup>, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

8  
9  
10 4 The 364 bp amplified fragment containing the *ttsI* partial gene sequence was then  
11  
12 5 cloned into the EcoRI site of the pK18mobsacB vector (Schäfer et al. 1994), generating  
13  
14 6 pK18*ttsI* plasmid. This plasmid was linearized with MluI endonuclease and had the ends  
15  
16 7 filled in with *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment. The Omega cassette contained in  
17  
18 8 the vector pHP45Ω (Prentki and Kirsch, 1984) was removed with SmaI enzyme and  
19  
20 9 inserted into the pK18*ttsI* linearized-filled-in plasmid, generating pK18*ttsI*Ω plasmid. This  
21  
22 10 plasmid was mobilized from *E. coli* DH5α to *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 strain by  
23  
24 11 triparental mating, using the helper plasmid pRK2013 (Figurski and Helinski, 1979).  
25  
26 12 Double recombination was selected by plating bacteria onto YEM plates containing the  
27  
28 13 appropriate antibiotics (tetracycline and spectinomycin). Putative *B. elkanii* mutant strains  
29  
30 14 (*B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*) were confirmed by PCR and Southern blots, using standard  
31  
32 15 procedures (Sambrook and Russel, 2001, data not shown).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 Cloning of promoter sequences into pPROBE NT vector

42  
43 18 The *tts*-box motif identified in the promoter region of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*  
44  
45 19 gene was isolated using the Site-Finding PCR approach as described by Tan et al. (2005).  
46  
47 20 The 700 bp fragment obtained was cloned into pGEM T-easy vector and totally sequenced  
48  
49 21 in both the forward and reverse directions. The *ttsI* promoter region was excised from  
50  
51 22 pGEM T-easy by PCR using pT*ttsI* sense (ACTCAACACACCCTCGCA) and *ttsI* REV  
52  
53 23 primers. The PCR conditions were the same as already described. The 700 bp amplified  
54  
55 24 fragment was filled in with *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment and subcloned into  
56  
57  
58  
59  
60



1 the SmaI site of the broad-host-range reporter pPROBE NT vector (Miller et al. 2000),  
2 generating pNTpptsI plasmid.

3 The *tts*-box motif from the *nopC* promoter region of *B. elkanii* SEMIA587 was  
4 amplified with primers pNopCFOR (TTGACGGTCGAGAGTTCTGT) and pNopCREV  
5 (CAGGACTTTTCCAGCTTTCA), which were designed according to the *B. elkanii*  
6 USDA61 *nopC* sequence (GenBank accession number FM 162234). The amplified  
7 fragment (approximately 1.0 kb) was cloned into pGEM T-Easy, sequenced in both the  
8 forward and reverse directions, and subcloned into pPROBE NT, digested with HindIII and  
9 SalI endonucleases, generating pNTpnopC plasmid.

10 The pPROBE NT constructs were mobilized into *B. elkanii* SEMIA587 wild type  
11 and mutant (SEMIA587 *ttsI*) strains by triparental matings using pRK2013 as the helper  
12 plasmid. Flavonoid induction was performed as described previously (Kobayashi et al.  
13 2004).

#### 15 **Measurements of GFP activity**

16 Optical density (OD 595) and fluorescence (excitation filter at 485 nm and emission  
17 filter at 535 nm) were measured on 100  $\mu$ l of cultures 24 h post-induction using a Plate  
18 Chameleon Multilabel Detection Platform (Hidex Oy, Turku, Finland). Optical densities  
19 and fluorescence were corrected to background levels using un-inoculated media, and the  
20 results represent the means of at least three independent experiments. Data were statistically  
21 analysed using the Student's *t*-test with a *P*-value of <0.05 considered as significant.

#### 23 **Electrophoretic Mobility Shift Assay**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 The *tts*-box identified in the promoter region of the *B. elkanii ttsI* gene was tested  
2 against a crude extract of *E. coli* BL21 expressing the *ttsI* gene of *B. elkanii* SEMIA587  
3 cloned into the expression vector pET-23a (+) (Novagen/EMD Biosciences). A crude  
4 extract of *E. coli* BL21 containing the empty pET-23a (+) vector was used as control. The  
5 complete sequence of *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene was PCR amplified using primers  
6 TtsIFor (GGTCATCGCATTTTTCAATC) and TtsIRev  
7 (TGTTGCTTTTCGAGTTCGATTT) designed from the *B. elkanii* USDA61 sequence  
8 available in GenBank database (GenBank accession number FM162234). The 900 pb  
9 amplified DNA fragment containing *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene was cloned into pGEM  
10 T-Easy® (Promega), and completely sequenced to verify fidelity of the PCR. The insert  
11 was excised from pGEM T-Easy using the *Apa*I (blunt ended with *Klenow* fragment-  
12 Invitrogen®) and *Sac*I sites. The pET-23a (+) expression vector was linearized with *Eco*RI  
13 (blunt ended with *Klenow* fragment) and *Sac*I, and ligated with the insert excised from  
14 pGEM T-Easy. This reaction was used to transform *E. coli* XL1-Blue competent cells. The  
15 cloning was confirmed by digestion and the plasmid (pET-23a-ttsI) was used to transform  
16 *E. coli* BL21 competent cells. *E. coli* strain carrying pET-23a-ttsI plasmid was induced with  
17 0.5mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) for 6 hours at 28°C. After this period,  
18 cells were precipitated, suspended in 500  $\mu$ L of deionized water, and disrupted by  
19 sonication. Two different amounts (4  $\mu$ L and 8  $\mu$ L) of the *E. coli* extract containing only  
20 soluble proteins were incubated with the DNA sequence corresponding to the *tts*-box  
21 present in the promoter region of the *ttsI* gene. The *ttsI* *tts*-box was a 148 bp fragment  
22 amplified with primers TBdo (GTCCATACACGCCAAGACCT) and TBup  
23 (GGTCATCGCATTTTTCAATC). All PCR conditions were the same as described to  
24 amplify the internal fragment of *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* gene. Binding conditions were

Campos, S. B. MPMI 17

1  
2  
3  
4 1 assayed with the Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) kit from Invitrogen ® as  
5  
6 2 specified by the supplier.  
7  
8 3

9  
10  
11 4 **Analysis of secreted proteins**

12  
13 5 Extracellular proteins from *B. elkanii* SEMIA587 wild type and *tsI* mutant strains,  
14  
15 6 under or without flavonoid induction, were recovered from 50 ml of RMS cultures grown  
16  
17 7 in an orbital shaker (180 rpm) for 72 h. Secreted proteins were extracted as described by  
18  
19 8 Viprey et al. (1998). Aliquots of purified proteins were separated on SDS-polyacrylamide  
20  
21 9 (SDS-PAGE) gels and stained with silver (Ausubel et al. 1991). For immuno detection  
22  
23 10 SDS-PAGE separated proteins were transferred to PVDF Immobilon-P membranes  
24  
25 11 (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) and probed with antibodies raised  
26  
27 12 against *Rhizobium* sp. NGR234 NopA and NopL proteins. Horseradish peroxidase-labelled  
28  
29 13 goat antirabbit immunoglobulin antibodies from the ECL kit (GE Lifesciences Amersham  
30  
31 14 Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) were used as secondary antibodies.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 16 **Nodulation tests**

40  
41 17 Nodulation tests were performed in Magenta jars as described by Skorpil et al.  
42  
43 18 (2005). All plants were grown at 18°C-28°C temperature, with a photoperiod of 16 h. Each  
44  
45 19 plant was inoculated with  $10^7$  bacteria and harvested 14 or 28 days after inoculation. Two  
46  
47 20 plants were grown per Magenta jar. At harvest, total nodule number per jar was determined  
48  
49 21 for each replicate. Only nitrogen-fixing (red) nodules were counted. Data from the  
50  
51 22 nodulation tests (at a minimum triplicates) were statistically analysed using the Student's *t*-  
52  
53 23 test with a *P*-value of <0.05 considered as significant. Plant seeds, *Glycine max* [(L.)  
54  
55 24 Merrill] cv. McCall and cv. Peking, *Macroptilium atropurpureum*, and *Vigna unguiculata*,  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 were obtained from the Laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes Supérieures  
2 (LBMPS, Université de Genève. Soybean *G. max* [(L.) Merrill] cv. EMBRAPA-48 was  
3 obtained from EMBRAPA-Soja (Londrina, PR, Brazil). The seeds were surface sterilized  
4 as previously described (Pueppke and Broughton 1999).

#### 6 ACKNOWLEDGEMENTS

7 The authors are grateful to Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária  
8 (FEPAGRO) for providing the *Bradyrhizobium* SEMIA587 strain, to Dr. Carmem Gottfried  
9 from Laboratório de Bioquímica, UFRGS, for the help and support in the GFP assay, and to  
10 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Soja, for the seeds of  
11 EMBRAPA 48 soybean cultivar. This work was supported by a grant and fellowships (in  
12 Brazil and Switzerland for S.B.C.) from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico  
13 e Tecnológico (CNPq/Brazil). We are indebted to Y.-Y. Aung and D. Gerber (Geneva  
14 University) for their help with this work. Financial support from the Fonds National Suisse  
15 de la Recherche Scientifique (Projects 3100AO-104097 and 3100AO-116858) to W.J.D.  
16 and W.J.B. is gratefully acknowledged.

#### 18 LITERATURE CITED

- 19 Ausmees, N., Kobayashi, H., Deakin, W.J., Marie, C., Krishnan, H.B., Broughton, W.J.,  
20 and Perret, X. 2004. Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of  
21 *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *J. Bacteriol.* 186 (14): 4774-4780.
- 22 Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, and J. Smith. 1991. Current  
23 protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, N.Y.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 Bartsev, A.V., Boukli, N.M., Deakin, W.J., Staehelin, C., and Broughton, W.J. 2003.  
2 Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp.  
3 NGR234. FEBS Lett. 554: 271-274.
- 4 Bartsev, A.V., Deakin, W.J., Boukli, N.M., McAlvin, C.B., Stacey, G., Malnoe, P.,  
5 Broughton, W.J., and Staehelin, C. 2004. NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp.  
6 NGR234, Thwarts Activation of Plant Defence Reactions. Plant Physiol. 134: 871-879.
- 7 Broughton, W. J., Wong, C.-H., Lewin, A., Samrey, U., Myint, H., Meyer Z. A., H.,  
8 Dowling, D. N., and Simon, R. 1986. Identification of *Rhizobium* plasmid sequences  
9 involved in recognition of *Psophocarpus*, *Vigna*, and other legumes. J. Cell Biol.  
10 102:1173-1182.
- 11 Dai, W.J., Zeng, Y., Xie, Z.P. and Staehelin, C. 2008. Symbiosis-promoting and deleterious  
12 effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. J.Bacteriol.  
13 190: 5101-5110.
- 14 Deakin, W.J., Marie, C., Saad, M.M., Krishnan, H.B. and Broughton, W.J. 2005. NopA Is  
15 Associated with Cell Surface Appendages Produced by the Type III Secretion System  
16 of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. Mol Plant Microbe Interact. 18 (5): 499-507.
- 17 Deakin, W.J. and Broughton, W.J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial  
18 protein secretion systems. Nature Rev. Microbiol. 7: 312-320.
- 19 Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R. 1980. Broad host range cloning  
20 system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*.  
21 Proc Natl Acad Sci USA 77: 7347-7351.
- 22 Ferreira, M.C., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Takemura, S.M. and Hungria, M. 2000.  
23 Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of  
24 bradyrhizobia nodulating soybean. Soil Biol. Biochem. 32, 627-637.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 Figurski, D.H. and Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of  
2 plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci  
3 USA 76:1648–1652.
- 4 Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X. 1997.  
5 Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387:394-401.
- 6 Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and  
7 plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:379-433.
- 8 Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M.M., Schumpp, O., Broughton, W.J.  
9 and Deakin, W.J. 2009. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during  
10 symbiosis. Mol. Microbiol. 71 (1): 92-106.
- 11 Kobayashi, H., Graven, Y. N., Broughton, W. J., and Perret, X. 2004. Flavonoids induce  
12 temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp.  
13 NGR234. Mol. Microbiol. 51:335-347.
- 14 Krause, A., Doerfel, A., and Göttfert, M. 2002. Mutational and transcriptional analysis of  
15 the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe  
16 Interact. 15:1228-1235.
- 17 Krishnan, H.B., Kuo, C. and Pueppke, S.G. 1995. Elaboration of flavonoid-induced  
18 proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both  
19 *nodD1* and *nodD2*, and is dependent on the cultivar specificity locus, *nodXWBTUV*.  
20 Microbiol. 141:2245-2251.
- 21 Krishnan, H.B., Kim, W.S. and Sun-Hyung, J. 2007. Calcium regulates the production of  
22 nodulation outer proteins (Nops) and precludes pili formation by *Sinorhizobium fredii*  
23 USDA257, a soybean symbiont. FEMS Microbiol. Lett. 271: 59-64.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 Lan, C-Y. and Igo, M.M. 1998. Differential expression of the OmpF and OmpC porin  
2 proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J. Bacteriol.*  
3 180:171-174.
- 4 López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montano, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A.,  
5 Espuny, M.R. and Ollero, F.J. 2008. Regulation and symbiotic significance of  
6 nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiol.* 154:  
7 1825–1836.
- 8 Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B.,  
9 Perret, X., and Broughton, W. J. 2003. Characterization of Nops, nodulation outer  
10 proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant-Microbe*  
11 *Interact.* 16:743-751.
- 12 Marie, C., Deakin, W. J., Ojanen-Reuhs, T., Diallo, E., Reuhs, B., Broughton, W. J., and  
13 Perret, X. 2004. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type  
14 III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol.*  
15 *Plant- Microbe Interact.* 17:958-966.
- 16 Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Ballati, P.A. and Pueppke, S.G. 1993. Molecular cloning  
17 and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation  
18 of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.* 9: 17-29.
- 19 Miller, W.G., Leveau, J.H.J. and Lindow, S.E. 2000. Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-  
20 Range Promoter-Probe Vectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 (11): 1243-1250.
- 21 Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K. and Gottfert, M. 2009. Genetic organization  
22 and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*.  
23 *FEMS Microbiol. Lett.* 295: 88-95.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1 Pallen M.J., Chaudhuri R.R. and Henderson I.R. 2003. Genomic analysis of secretion  
2 systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 519-527.
- 3 Pueppke, S.G. and Broughton, W.J. 1999. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii*  
4 USDA257 Share Exceptionally Broad, Nested Host Ranges. *Mol. Plant-Microbe*  
5 *Interact.* 12 (4): 293-318.
- 6 Rumjanek, N.G., Dobert, R.C., van Berkum, P. and Triplett, E.W 1993. Common soybean  
7 inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ.*  
8 *Microbiol.* 59, 4371-4373.
- 9 Saad, M.M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I.R., Mansfield, J.W., Broughton, W.J. and  
10 Deakin, W.J. 2005. NopB, a Type III Secreted Protein of *Rhizobium* sp. Strain  
11 NGR234, Is Associated with Pilus-Like Surface Appendages. *J. Bacteriol.* 187 (3):  
12 1173-1181.
- 13 Sadowsky, M.J., Tully, R.E., Cregan, P.B. and Keyser, H.H. 1987. Genetic diversity in  
14 *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific  
15 nodulation of soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2624-2630
- 16 Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold  
17 Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- 18 Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. 1994. Small  
19 mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid  
20 pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium*  
21 *glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- 22 Skorpil, P., Saad, M. M., Boukli, N. M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W. J.,  
23 and Deakin, W. J. 2005. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia*  
2 *congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol. Microbiol.* 57:1304-1317.

3 Stüb, C., Hempel, J., Zehner, S., Krause, A., Patschkowski, T., and Göttfert, M. 2006.  
4 Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium*  
5 *japonicum*. *J. Biotechnol.* 126:69-77.

6 Tan, G., Gao, Y., Shi, M., Zhang, X., He, S., Chen, Z. and An, C. 2005. SiteFinding-PCR: a  
7 simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.* 33 (13):  
8 e122.

9 Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell  
10 Scientific, Oxford.

11 Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., and Perret, X. 1998.  
12 Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol.*  
13 *Microbiol.* 28:1381-1389.

14 Wasseem, R., Kobayashi, H., Kambara, K., Le Quéré, A., Walker, G. C., Broughton, W. J.,  
15 and Deakin, W. J. 2008. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234  
16 by binding to *tts boxes*. *Mol. Microbiol.* 68:736-748.

17 Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K. and Gottfert, M. 2008. Expression of the  
18 *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of  
19 the associated *tts box* promoter. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1087–1093.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 **Figure captions**

2

3 **Fig. 1.** Comparison of type three secretion (*tts*) box motifs found in the promoter regions of  
4 *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 *ttsI* and *nopC* genes with the *tts*-box consensus  
5 sequence described for *B. elkanii* USDA61 T3SS genes (Okazaki et al. 2009). In the  
6 consensus sequence, all invariant nucleotides are shown in capital letters. Lower case letters  
7 are used for nucleotides conserved in at least 50% of the sequences. Bold letters in the *tts*-  
8 box sequences of SEMIA587 indicate nucleotides that are identical to the consensus  
9 sequence. Numbers indicate distances in bp between the *tts* box and the assumed  
10 translational start site of the corresponding open reading frame.

11

12 **Fig. 2.** Expression analysis of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* and *nopC* *tts*-box motifs. GFP  
13 activity was determined 24 h after induction with genistein or daidzein for strains carrying  
14 the promoter regions of *ttsI* and *nopC* genes fused to the promoter-less *gfp* gene. A: *tts*-  
15 box of *ttsI* promoter region. B: *tts*-box of *nopC* promoter region. In white: constructions in  
16 the wild type strain (*B. elkanii* SEMIA587) and in grey the constructions in the mutant  
17 strain (*B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*).\*: statistically significant differences (Student's *t*-test  
18 with a *P*-value of <0.05).

19

20 **Fig. 3.** Polyacrylamide gel (10%) showing the binding of TtsI protein to the *tts*-box  
21 promoter region of the *ttsI* gene of *B. elkanii* SEMIA587. Lane 1: a 148 bp DNA fragment  
22 containing the *ttsI* *tts*-box; Lane 2: the fragment on lane 1 was mixed with 4 µl of a crude  
23 extract of *E. coli* BL21 expressing the TtsI protein from the expression vector pET-23a (+);  
24 Lane 3: the fragment on lane 1 was mixed with 8 µl of a crude extract of *E. coli* BL21

1  
2  
3  
4 1 expressing the TtsI protein from the expression vector pET-23a (+); Lane 4: the fragment  
5  
6 2 on lane 1 was mixed with the crude extract of *E.coli* BL21 containing the empty expression  
7  
8 3 vector pET-23a (+). The gel was stained with Sybr Green from the EMSA kit  
9  
10 4 (Invitrogen®), and visualized under UV.  
11  
12  
13 5

14  
15 6 **Fig. 4.** Immunodetection of NopA and NopL proteins by the correspondent  $\alpha$ -NopA and  $\alpha$ -  
16  
17 7 NopL antibodies in extracellular-protein extracts of non-induced cultures (-) and genistein  
18  
19 8 induced cultures (+). Wt = *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587.  $\Omega$ ttsI = *B. elkanii*  
20  
21 9 SEMIA587 *ttsI* mutant strain. Samples were separated in 12% SDS-PAGE.  
22  
23  
24  
25 10

26  
27 11 **Fig. 5.** Nodulation properties of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 wild type and *ttsI*  
28  
29 12 mutant strains. Mature nodules were counted after 14 and 28 days. Values (average +/- SD)  
30  
31 13 were determined from three plants in at least three independent tests. Light grey bars =  
32  
33 14 *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 wild type strain; Dark grey bars = *B. elkanii*  
34  
35 15 SEMIA587 *ttsI* mutant strain. EMBRAPA-48, McCall and Peking are soybean (*Glycine*  
36  
37 16 *max* [(L.) Merrill]) cultivars. \*: statistically significant differences (Student's *t*-test with a *P*-  
38  
39 17 value of <0.05).  
40  
41  
42  
43  
44 18

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

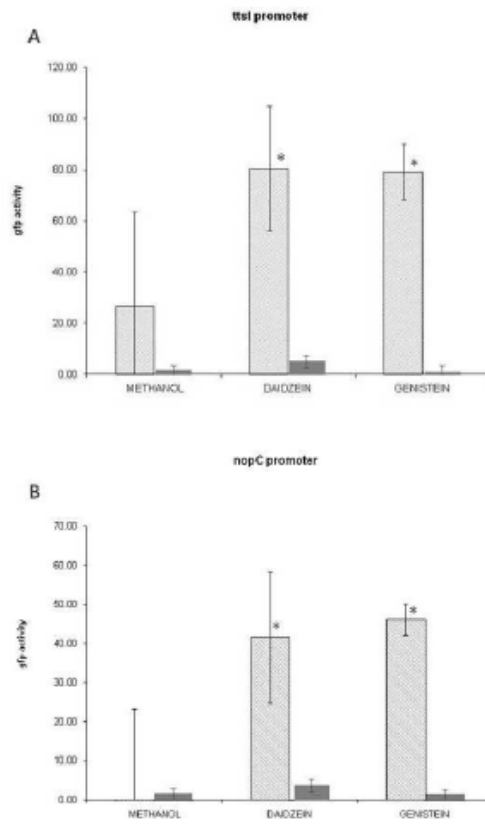
ctGTCAGttt gtcGaacctc ttggtcaacc 45 bp *ttsI*  
**tcGTCAGctt** gtcGaa**Actg** atgcttccat 59 bp *nopC*  
 tcgTCAGctT ntcGaaaGct annnctncta consensus

Comparison of type three secretion (*tts*) box motifs found in the promoter regions of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 *ttsI* and *nopC* genes with the *tts*-box consensus sequence described for *B. elkanii* USDA61 T3SS genes (Okazaki et al. 2009). In the consensus sequence, all invariant nucleotides are shown in capital letters. Lower case letters are used for nucleotides conserved in at least 50% of the sequences. Bold letters in the *tts*-box sequences of SEMIA587 indicate nucleotides that are identical to the consensus sequence. Numbers indicate distances in bp between the *tts* box and the assumed translational start site of the corresponding open reading frame.

149x73mm (96 x 96 DPI)

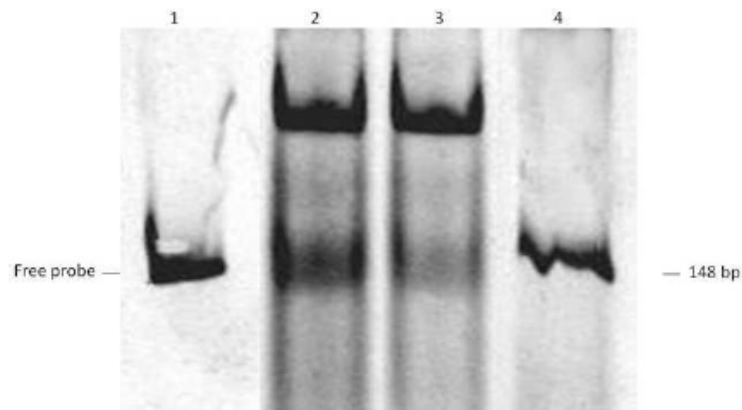
Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



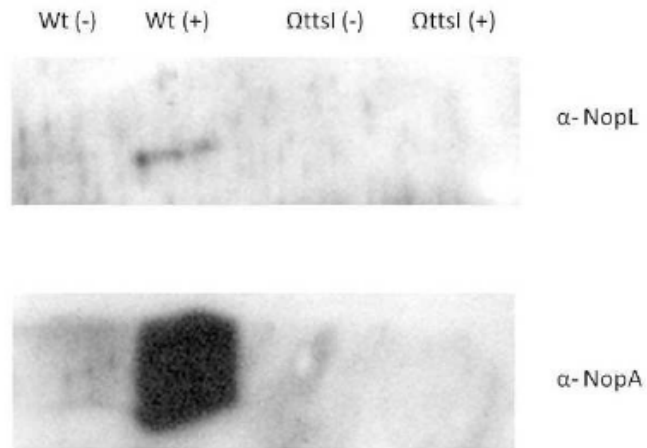
Expression analysis of the *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* and *nopC* *tts*-box motifs. GFP activity was determined 24 h after induction with genistein or daidzein for strains carrying the promoter regions of *ttsI* and *nopC* genes fused to the promoter-less *gfp* gene. A: *tts*-box of *ttsI* promoter region. B: *tts*-box of *nopC* promoter region. In white: constructions in the wild type strain (*B. elkanii* SEMIA587) and in grey the constructions in the mutant strain (*B. elkanii* SEMIA587 *ttsI*).\*: statistically significant differences (Student's t-test with a P-value of <0.05).  
156x254mm (96 x 96 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



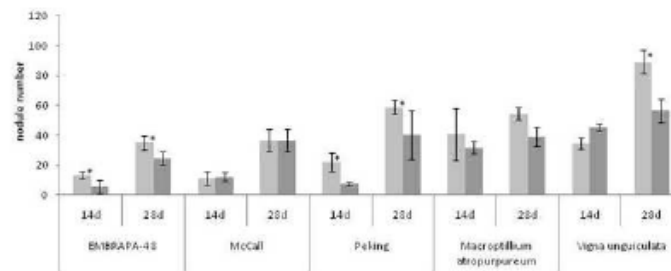
Polyacrylamide gel (10%) showing the binding of TtsI protein to the *tts*-box promoter region of the *ttsI* gene of *B. elkanii* SEMIA587. Lane 1: a 148 bp DNA fragment containing the *ttsI* *tts*-box; Lane 2: the fragment on lane 1 was mixed with 4  $\mu$ l of a crude extract of *E. coli* BL21 expressing the TtsI protein from the expression vector pET-23a (+); Lane 3: the fragment on lane 1 was mixed with 8  $\mu$ l of a crude extract of *E. coli* BL21 expressing the TtsI protein from the expression vector pET-23a (+); Lane 4: the fragment on lane 1 was mixed with the crude extract of *E. coli* BL21 containing the empty expression vector pET-23a (+). The gel was stained with Sybr Green from the EMSA kit (Invitrogen®), and visualized under UV.  
170x100mm (96 x 96 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Immunodetection of NopA and NopL proteins by the correspondent  $\alpha$ -NopA and  $\alpha$ -NopL antibodies in extracellular-protein extracts of non-induced cultures (-) and genistein induced cultures (+). Wt = *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587.  $\Omega$ ttsI = *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* mutant strain. Samples were separated in 12% SDS-PAGE.  
177x116mm (96 x 96 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Nodulation properties of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 wild type and *ttsI* mutant strains. Mature nodules were counted after 14 and 28 days. Values (average  $\pm$  SD) were determined from three plants in at least three independent tests. Light grey bars = *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 wild type strain; Dark grey bars = *B. elkanii* SEMIA587 *ttsI* mutant strain. EMBRAPA-48, McCall and Peking are soybean (*Glycine max* [(L.) Merrill]) cultivars.\*: statistically significant differences (Student's t-test with a P-value of  $<0.05$ ).  
170x100mm (96 x 96 DPI)