



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SIMONE BORTOLAN

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC*, *NODW* E  
*NOPP* NA ESTIRPE CPAC 15 (=SEMIA 5079) DE  
*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* PELA TÉCNICA DE RT-  
QPCR**

SIMONE BORTOLAN

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC*, *NODW* E  
*NOPP* NA ESTIRPE CPAC 15 (=SEMIA 5079) DE  
*BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* PELA TÉCNICA DE RT-  
QPCR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Fernando Gomes Barcellos

Londrina  
2009

SIMONE BORTOLAN

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC*, *NODW* E *NOPP*  
NA ESTIRPE CPAC 15 (=SEMIA 5079) DE *BRADYRHIZOBIUM*  
*JAPONICUM* PELA TÉCNICA DE RT-QPCR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos  
UEL - Londrina - PR

---

Dra. Francismar Corrêa Marcelino  
EMBRAPA-CNPSO – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Mariangela Hungria  
EMBRAPA-CNPSO – Londrina - PR

Londrina, 25 de Maio de 2009.

## DEDICATÓRIA

*A Deus pela sua grandiosidade e amor, pelas pessoas  
que Tu colocaste em minha vida e capacidade que me  
deste para vencer mais esta etapa.*

*A minha mãe pela minha formação moral e pelo seu  
empenho durante todos esses anos.*

*S.B.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus amigos que me apoiaram em todos os momentos.*

*Aos orientadores deste trabalho.*

*todos do laboratório onde este trabalho foi desenvolvido.*

*À aqueles que não participaram diretamente, cujo apoio foi fundamental.*

*“Mas como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o ama”.*

*I Coríntios 2.9*

BORTOLAN, Simone. **Avaliação da expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* na estirpe CPAC 15 (=SEMIA 5079) de *Bradyrhizobium japonicum* pela técnica de RT-qPCR.** 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) na soja ocorre através da simbiose com bactérias (rizóbios), como a espécie *Bradyrhizobium japonicum*, seu principal simbiote. Contudo, para o estabelecimento da simbiose é necessário troca de sinais moleculares e expressão de vários genes na planta hospedeira e na bactéria. A soja secreta indutores de genes de nodulação, principalmente flavonóides, dentre os quais o mais ativo é a genisteína que induz genes específicos em *B. japonicum* como o box *nodABC*, responsável pela formação da estrutura básica dos Fatores de nodulação (Fator Nod), estes por sua vez atuam no processo de infecção do pelo da raiz da planta. Além desses genes, os flavonóides são capazes de induzir outros genes relacionados com o processo infeccioso, como o *nodW* e o *nopP*. O primeiro faz parte do sistema de dois-componentes que também ativa os genes *nodABC*, enquanto o segundo pertence ao Sistema de Secreção Tipo III, responsável pela produção de proteínas efetoras que atuam inibindo a resposta de defesa do hospedeiro. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão, por RT-qPCR, dos genes *nodW*, *nodC* e *nopP* da estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*, sob indução pelo flavonóide genisteína e por exsudatos de semente de soja composto por vários indutores. A expressão foi avaliada após os períodos de crescimento *in vitro* por 15 min, 1 h, 4 h, 8 h e 48 h. Os resultados obtidos revelaram que os genes *nodW* e *nodC* apresentaram os maiores expressões imediatamente após o contato com o indutor (no tempo de 15 min), sendo maior com genisteína do que com exsudato de soja, indicando que a atividade desses genes pode se fazer necessária no início do processo infeccioso. Em relação ao gene *nopP*, a expressão induzida por genisteína pode não ter sido diferente entre os tempos analisados devido a variabilidade das repetições, entretanto, células crescidas por 48 hs com genisteína apresentaram um aumento na expressão do gene sugerindo que sua expressão ocorra após um tempo maior de indução pelo flavonóide. Com base nos padrões de expressão observados concluiu-se que a genisteína é um dos principais indutores de genes de nodulação em *B. japonicum* e dos genes que atuam no processo de infecção, como o gene *nopP*. Assim, esses genes estudados atuam no processo de nodulação e infecção da soja pelo *Bradyrhizobium*, os resultados obtidos podem ser úteis em práticas que visam otimizar o processo de nodulação e FBN em soja.

**Palavras-chave:** Genes de nodulação. Flavonóides. Sistema de secreção tipo III. Sistema de dois-componentes

BORTOLAN, Simone. **Expression of the *nopP*, *nodW* and *nodC* genes on the CPAC 15 strain (=SEMIA 5079) of *Bradyrhizobium japonicum* evaluated by the technique of RT – qPCR.** 2009. 75f. Dissertação (mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

## ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (BNF) in soybean occurs through symbiosis with bacteria (rhizobia) and the species *Bradyrhizobium japonicum*, the main symbiont. However, for the establishment of the symbiosis is necessary exchange of molecular signals and the expression of several genes in the host plant and bacteria. The soybean secret of inducers of nodulation genes, mainly flavonoids, among which the most active is the genistein that induces specific genes in *B. japonicum* as *nodABC* box, responsible for the formation of the basic structure of the nodulation factors (Nod factor), these in turn affect the process of infection by the root of the plant. In addition to these genes, the flavonoids are able to induce other genes related to the infectious process, such as *nodW* and *nopP*. The first part of a two-component system that activates the genes *nodABC*, while the second belongs to the Type III Secretion System, responsible for the production of effector proteins that act by inhibiting the response of the host defense. Within this context, the objective of this study was to evaluate the expression by RT-qPCR of genes *nodW*, *nodC* and *nopP* strain CPAC 15, *B. japonicum*, under induction by flavonoid genistein and soybean seed exudates composed of various inducers. The expression was evaluated after periods of growth *in vitro* for 15 min, 1 h, 4 h, 8 h and 48 h. The results showed that *nodW* and *nodC* genes showed higher expression immediately after contact with the inducer (in time of 15 min), and with more than genistein exudate of soybean, indicating that the activity of these genes can make necessary early in the infectious process. On the *nopP* gene, the expression induced by genistein may not have been different between the times tested due to variability of repetitions, however, cells grown for 48 hours with genistein showed an increase in the expression of the gene suggesting that its expression occurs after a time greater induction of the flavonoid. Based on observed patterns of expression concluded that genistein is one of the main inducers of nodulation genes in *B. japonicum* and genes that act in the process of infection, such as gene *nopP*. Thus, these genes studied acting in the infection and nodulation of soybean by *Bradyrhizobium*, the results may be useful in practices aimed at optimizing the process of nodulation and BNF in soybean.

**Keywords:** Modulation genes. Flavonoids. Type III secretion system. Two-component system

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Indução da proteína NodD1 em <i>B. japonicum</i> e transcrição dos genes de nodulação.....	20
<b>Figura 2</b> – Atuação das proteínas NodA, NodB e NodC na síntese dos Fatores de Nodulação.....	21
<b>Figura 3</b> – Etapas do processo de infecção do pelo radicular.....	22
<b>Figura 4</b> – Esquema do Sistema de Secreção Tipo III (SSTT) durante a infecção do patógeno na planta.....	24
<b>Figura 5</b> – Esquema do Sistema de secreção Tipo III (SSTT) injetando proteínas efectoras (Nops) na planta hospedeira.....	25
<b>Figura 6</b> – Cascata da ativação do box <i>tts</i> e dos genes <i>nopP</i> e <i>nopL</i> pela indução por genisteína.....	26
<b>Figura 7</b> – Ativação das proteínas NodD <sub>1</sub> , NodV e NodW, <i>nod</i> box e do gene <i>ttsI</i> pela indução por genisteína.....	28
<b>Figura 8</b> – Fosforilação da proteína sensora e reguladora do sistema de dois-componentes.....	29
<b>Figura 9</b> – Expressão do gene <i>nodW</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) em diferentes tempos de indução.....	40
<b>Figura 10</b> – Expressão do gene <i>nodC</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) em diferentes tempos de indução.....	42
<b>Figura 11</b> – Expressão do gene <i>nopP</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) em diferentes tempos de indução.....	43
<b>Figura 12</b> – Expressão do gene <i>nodC</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) após 48hs de indução.....	47
<b>Figura 13</b> – Expressão do gene <i>nodW</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) após 48hs de indução.....	49
<b>Figura 14</b> – Expressão do gene <i>nopP</i> de <i>B. japonicum</i> (CPAC 15) após 48hs de indução.....	51

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Flavonóides indutores de genes- <i>nod</i> encontrados na soja. ....	19
<b>Quadro 2</b> – Sequência de primers utilizados na reação de PCR em Tempo Real .....	35
<b>Quadro 3</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodW</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).....	61
<b>Quadro 4</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodW</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2).....	62
<b>Quadro 5</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodW</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3).....	63
<b>Quadro 6</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodC</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).....	64
<b>Quadro 7</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodC</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2).....	65
<b>Quadro 8</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodC</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3).....	66
<b>Quadro 9</b> – Resultado da expressão do gene <i>nopP</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).....	67
<b>Quadro 10</b> – Resultado da expressão do gene <i>nopP</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2) .....	68
<b>Quadro 11</b> – Resultado da expressão do gene <i>nopP</i> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3) .....	69
<b>Quadro 12</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodW</i> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3) .....	70
<b>Quadro 13</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodW</i> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3) .....	71
<b>Quadro 14</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodC</i> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3) .....	72
<b>Quadro 15</b> – Resultado da expressão do gene <i>nodC</i> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3) .....	73
<b>Quadro 16</b> – Resultado da expressão do gene <i>nopP</i> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3) .....	74

<b>Quadro 17</b> – Resultado da expressão do gene <i>nopP</i> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3) .....	75
---	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO E SIMBIOSE COM LEGUMINOSAS .....	15
2.2 IMPORTÂNCIA DA SOJA NO BRASIL E ESTIRPES RECOMENDADAS PARA INOCULANTES COMERCIAIS .....	16
2.3 PROCESSO DE NODULAÇÃO E OS GENES DE NODULAÇÃO .....	18
2.4 SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III (SSTT) E O GENE NOPP .....	22
2.5 SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES.....	27
<b>3 OBJETIVO</b> .....	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 ESTIRPE DE BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM .....	31
4.2 ANÁLISE EM DIFERENTES TEMPOS DE INDUÇÃO GÊNICA.....	31
4.2.1 Preparo da Genisteína.....	31
4.2.2 Obtenção e Preparo do Exsudato de Semente de Soja .....	31
4.3 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA NODULAÇÃO PELA GENISTEÍNA NOS TEMPOS INICIAIS DE NODULAÇÃO .....	32
4.4 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA NODULAÇÃO PELA GENISTEÍNA E EXSUDATO DE SEMENTE .....	32
4.5 EXTRAÇÃO DO RNA .....	33
4.6 TRATAMENTO COM DNASE .....	33
4.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	34
4.8 DESENHO DOS PRIMERS PARA O PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	34
4.9 RT-qPCR .....	35
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38

5.1 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES NODC, NODW E NOPP NOS TEMPOS INICIAIS DE NODULAÇÃO APÓS A INDUÇÃO COM O FLAVONÓIDE GENISTEÍNA.....	38
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES NODC, NODW E NOPP SOB INDUÇÃO DE GENISTEÍNA E EXSUDATO DE SEMENTE DE SOJA.....	44
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) possui grande importância na economia brasileira devido ao fato de seus grãos apresentarem alta quantidade de proteínas e por ser uma das principais fontes de óleo vegetal no mundo (MONTEROS *et al.*, 2008). Contudo, o cultivo dessa leguminosa seria inviável sem o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Como exemplo da importância econômica, devido a esse processo, estima-se uma economia de cerca de 6,6 bilhões de dólares por safra de soja, que deixam de ser usados na compra de adubos nitrogenados (HUNGRIA *et al.*, 2007).

A FBN é realizada pela simbiose de leguminosas com bactérias diazotróficas, as quais possuem um complexo enzimático capaz de converter nitrogênio atmosférico em amônia; esta, por sua vez, pode ser incorporada em diversas formas de nitrogênio orgânico para a utilização pela planta (DROZDOWICS, 1997).

O processo de FBN em algumas bactérias ocorre dentro de nódulos da planta hospedeira que está em simbiose com esses microrganismos. Os nódulos são resultado da infecção causada pelos simbiosites, sendo que esse processo de nodulação envolve várias etapas de expressão de genes específicos da planta hospedeira e da bactéria (genes de nodulação) (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Em *Bradyrhizobium japonicum*, o principal simbiote da soja, a transcrição dos genes de nodulação como os genes *nodABC* é controlada pela ativação da proteína NodD<sub>1</sub>, sendo esta ativada por flavonóides secretados pela soja, resultando na produção dos fatores Nod pela bactéria (ROCHE *et al.*, 1996).

Outro sistema também atua na transcrição dos genes *nodABC*, conhecido como sistema de dois-componentes, representado pelas proteínas reguladoras NodV (sensora) e NodW (reguladora). Na presença do flavonóide a proteína NodV é fosforilada e o fosfato resultante é transferido para a proteína NodW, que passa a se ligar na sequência de DNA da região dos genes *nodABC*, ativando a transcrição desses genes (BIJLSMA *et al.*, 2003).

No entanto, para que ocorra eficientemente a infecção, microsimbiosites como *B. japonicum* lançam mão de um sistema chamado de Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT). Esse sistema tem por finalidade formar um

aparato semelhante a uma “agulha” que atravessa a membrana da célula hospedeira e injeta proteínas efetoras (Nops) que atuarão no citoplasma da célula, alterando o metabolismo e causando supressão das defesas basais contra o microrganismo, levando à infecção (BÜTTNER; BONAS, 2006).

Assim, quando a região reguladora “box” do *nodABC* é ativada tanto pela NodD<sub>1</sub>, como pela NodW, além da transcrição dos genes de nodulação, ocorre também a transcrição do gene *ttsI* relacionado ao SSTT. A proteína codificada por esse gene, a TtsI, ativa a transcrição de genes como o *nopP*, culminando na secreção da proteína efetora NopP, que impedirá a resposta de defesa do hospedeiro (LANG *et al.*, 2008).

Atualmente, no Brasil, em substituição aos fertilizantes nitrogenados, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para o uso em inoculantes comerciais em culturas de soja (*Glycine max* (L.) Merr). Duas são pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (SEMIA, “Seção de Microbiologia Agrícola”) e a SEMIA 5019 (=29W), recomendadas desde 1979, e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a CPAC 15 (=SEMIA 5079) e a CPAC 7 (=SEMIA 5080), que vêm sendo utilizadas intensamente em inoculantes comerciais desde 1992 (HUNGRIA *et al.*, 2006). A CPAC 15 é uma variante natural da SEMIA 566, obtida a partir do reisolamento de estirpes de nódulos de soja, em solos do DF, vários anos após a última inoculação, buscando aquelas adaptadas, mas com elevada capacidade de FBN e competitividade (HUNGRIA *et al.*, 2006a; WILLENS, 2006).

Devido ao lançamento de cultivares de soja mais produtivas, o uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos que já receberam inoculantes anteriormente (com estirpes que nem sempre são as mais eficientes), se faz necessário um processo contínuo de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas, que pode ser facilitado pelo conhecimento prévio das funções de genes relacionados ao processo (HUNGRIA *et al.*, 2007).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a expressão desses genes, envolvidos com a capacidade de infecção e nodulação da soja, identificados por Godoy *et al.* (2008), a partir da estirpe *B. japonicum* CPAC15, sob a indução com flavonóides pela técnica de RT-qPCR, a fim de permitir o desenvolvimento de novas estratégias de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas para o processo de FBN na soja.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO E SIMBIOSE COM PLANTAS LEGUMINOSAS

O nitrogênio ( $N_2$ ), por ser um dos constituintes dos ácidos nucleicos, proteínas, entre outras moléculas que são fundamentais para os processos biológicos, com exceção da água, é geralmente considerado o nutriente limitante ao crescimento de plantas; assim, é requerido em maior quantidade pelas mesmas (TREVASKIS *et al.*, 2002; HUNGRIA *et al.*, 2007).

O grande reservatório de  $N_2$  encontra-se na atmosfera, que apresenta em sua composição cerca de 80% desse elemento. Organismos eucariontes, como as plantas, são incapazes de absorver o  $N_2$  e convertê-lo a uma forma assimilável, devido à tripla ligação que existe entre os átomos do  $N_2$ , que é uma das mais fortes que se tem conhecimento na natureza (HUNGRIA *et al.*, 1994; ARAÚJO; CARVALHO, 2006). Contudo, alguns microrganismos procariotos conhecidos como diazotróficos são capazes de assimilar o  $N_2$  atmosférico em um processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Neste processo esses microrganismos convertem o  $N_2$  da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pelas plantas (MORGANTE, 2003).

A redução do  $N_2$  atmosférico à amônia é realizada por um complexo enzimático denominado nitrogenase, que possui a capacidade de clivar a tripla ligação do  $N_2$ . Este complexo é composto por duas proteínas diferentes, a dinitrogenase (Mo-Fe proteína) e dinitrogenase-redutase (Fe-proteína) (DROZDOWICZ, 1997). A nitrogenase é bastante sensível ao oxigênio, pois ele provoca desnaturação irreversível de ambos os componentes protéicos. Desta forma, os microrganismos fixadores de  $N_2$  apresentam mecanismos capazes de proteger a nitrogenase da ação do oxigênio (DROZDOWICZ, 1997). Assim, a FBN em algumas bactérias ocorre dentro de nódulos de plantas hospedeiras leguminosas, em simbiose com essas bactérias. Esses microrganismos são conhecidos como fixadores simbióticos, como exemplo, estão as bactérias dos

gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, (= *Ensifer*), entre outros (DROZDOWICZ, 1997; ARAÚJO; CARVALHO, 2006).

Os nódulos estão presentes em raízes de plantas leguminosas e são formados como resultado da infecção provocada pelas bactérias fixadoras simbióticas. Plantas leguminosas como a soja e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) são infectadas, principalmente, por diazotróficos dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente. O processo de nodulação envolve múltiplas etapas e a expressão de genes específicos da planta hospedeira e da bactéria. O processo se inicia com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos (em geral, flavonóides) que, facilitam a colonização da rizosfera, e outros compostos que apresentam ação quimiotática, possibilitando que as bactérias cheguem até a raiz das plantas hospedeiras, às quais se aderem. Esses flavonóides desencadeiam na bactéria a produção de fatores de nodulação (fatores Nod). Os fatores Nod são lipooligossacarídeos quitinos específicos que interagem com a planta, apresentando como primeiro efeito a curvatura do pêlo radicular; em seguida promovem a divisão das células corticais e conduzem à formação do nódulo. Quando as bactérias penetram o pêlo da raiz são internalizadas em um compartimento circundado por uma membrana denominado de simbiossomo, onde passam a ser chamadas de bacterióides (VARGAS; HUNGRIA, 1997; TREVASKIS *et al.*, 2002; HIRSCH *et al.*, 2003; STACEY *et al.*, 2006).

## 2.2 IMPORTÂNCIA DA SOJA NO BRASIL E ESTIRPES RECOMENDADAS PARA INOCULANTES COMERCIAIS

A cultura de soja, no Brasil, tem uma importância cada vez maior para o País, como cultura de exportação. É relevante particularmente por ser uma das principais fontes de óleo vegetal representando aproximadamente 27% da produção total de óleo comestível no mundo e, também, por ser uma importante fonte protéica na alimentação. Participa, portanto cada vez mais, direta ou indiretamente, na dieta brasileira; a estimativa é de que a safra brasileira de 2009 produza 57,63 milhões de toneladas de soja para a exportação (VARGAS; HUNGRIA, 1997; MONTEROS *et al.*, 2008; CONAB, 2009).

A cultura dessa leguminosa seria inviável sem a contribuição da FBN. Hoje, o Brasil ocupa a posição de liderança em benefícios da FBN com a cultura da soja, e o processo biológico resulta em uma economia estimada em cerca de 6,6 bilhões de dólares por safra, que deixam de ser usados na compra de adubos nitrogenados. Com isso, a inoculação de sementes com estirpes de rizóbios selecionadas é fundamental para a economia brasileira, sendo de baixo custo, segura e eficiente (VARGAS; HUNGRIA, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2006b; HUNGRIA *et al.*, 2007).

No Brasil, os solos são, originalmente, isentos de estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de nodular eficientemente a soja, no entanto, foram selecionadas estirpes adaptadas às cultivares e condições ambientais brasileiras. Desde o período de expansão comercial da soja, essas estirpes selecionadas são recomendadas para produção de inoculantes comerciais para soja, considerando sua capacidade competitiva, produção de nódulos e taxa de FBN (HUNGRIA *et al.*, 2007; VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja no Brasil. Duas são pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (SEMIA, “Seção de Microbiologia Agrícola”) e a SEMIA 5019 (=29W), recomendadas desde 1979, e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a CPAC 15 (=SEMIA 5079) e a CPAC 7 (=SEMIA 5080), que vêm sendo utilizadas intensamente em inoculantes comerciais desde 1992 (FAGAN *et al.*, 2007).

A estirpe CPAC 15 é uma variante natural da SEMIA 566, obtida a partir do reisolamento de estirpes de nódulos de soja, em solos do DF, vários anos após a última inoculação, buscando aquelas adaptadas, mas com elevada competitividade e capacidade de FBN (HUNGRIA *et al.*, 2006a).

Em termos econômicos, o lançamento de cultivares de soja mais produtivas, o uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos que já receberam inoculantes anteriormente (com estirpes que nem sempre são as mais eficientes), demandam um processo contínuo de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas, que pode ser facilitado pelo conhecimento prévio de genes relacionados às funções desejadas (HUNGRIA *et al.*, 2007). Portanto, a análise da expressão de genes relacionados com o processo de infecção e nodulação das

bactérias simbiotes pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas para o processo de FBN na soja.

### 2.3 PROCESSO DE NODULAÇÃO E OS GENES DE NODULAÇÃO

A formação do nódulo envolve uma série de trocas de moléculas sinalizadoras entre a planta e a bactéria. A planta hospedeira secreta substâncias como aminoácidos, CO<sub>2</sub>, hormônios, ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, proteínas, flavonóides, entre outras (BROUGHTON *et al.*, 2003).

Flavonóides são compostos fenólicos sintetizados em várias partes da planta, apresentando funções que incluem a proteção contra danos causados pela radiação UV, proteção contra insetos e microrganismos patogênicos, modulação da distribuição de auxinas, além de atuarem como pigmentos ou co-pigmentos influenciando na coloração de flores e como moléculas sinais para a simbiose com microrganismos (GRAHAM, 1991; SUBRAMANIAN *et al.*, 2007).

Em 1944, os flavonóides foram reportados em exsudatos de raízes, porém, os específicos como genisteína, daidzeína, etc., não foram identificados e quantificados até 40 anos depois. Em 1986, foi descoberta a indução dos flavonóides sobre os genes de nodulação (genes *nod*) (PETERS *et al.*, 1986; PHILLIPS; STREIT, 1995). Logo depois, foi confirmado que flavonóides liberados da soja como, daidzeína e genisteína, induzem a expressão de genes de nodulação em *B. japonicum* (KOSSLAK *et al.* 1987).

Segundo Subramanian *et al.* (2007), as isoflavonas (classe de flavonóides) são as maiores indutores dos genes-*nod* em estipes de *B. japonicum*, o principal simbiote de soja. Além disso, a existência da nodulação é diretamente influenciada pela presença de flavonóides confirmando, assim, que esses compostos são indispensáveis para a nodulação. Todavia, existem outros compostos não-flavonóides, como betaínas e xantonas, que também induzem a expressão dos genes de nodulação (SUBRAMANIAN *et al.*, 2007).

O quadro 1 mostra os diferentes flavonóides produzidos pela soja que induzem a expressão dos genes *nod*.

**Quadro 1** – Flavonóides indutores de genes-*nod* encontrados na soja.

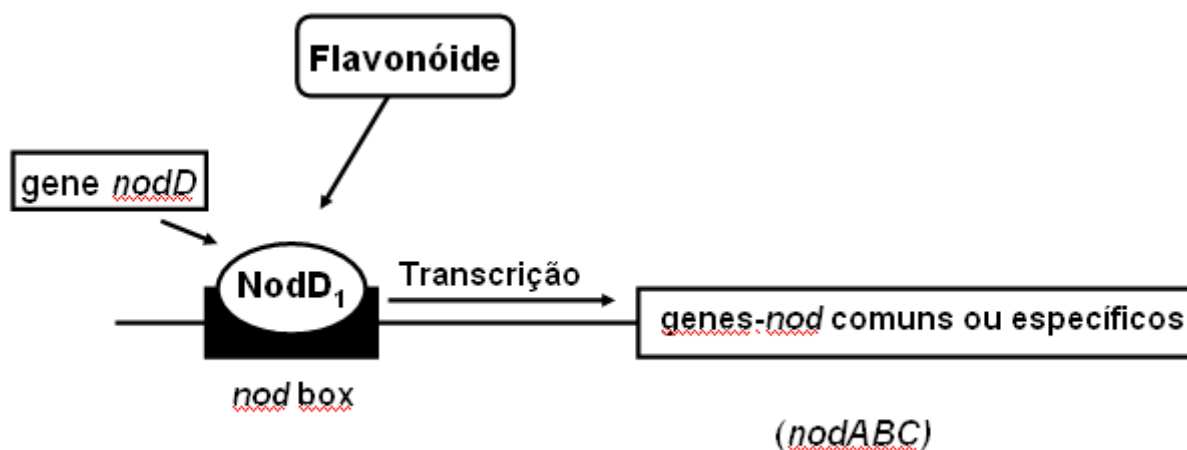
Fonte	Composto
Semente e exsudato de raiz	Genisteína
	Genisteína-7- <i>O</i> -glucosídeo
	Genisteína-7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonilglucosídeo)
	Daidzeína
	Daidzeína-7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonilglucosídeo)
	Daidzeína glucosídeo com acetilação
Exsudato de raiz	Isoliquiritigenina
	Coumestrol
	Gliciteína

**Fonte:** Adaptado de Phillips e Streit (1995) e Broughton *et al.* (2000).

Como consequência da indução dos genes-*nod* por flavonóides, há a produção dos fatores de nodulação, ou fatores Nod, pelas bactérias simbiotes, assim, esses genes codificam proteínas e enzimas envolvidas na biossíntese e secreção desses fatores. Os genes de nodulação (*nod*, *noe* e *noI*) estão envolvidos em ambos os processos de infecção e nodulação na planta hospedeira e sua inativação pode resultar em variados fenótipos, como a ausência de nódulos (Nod<sup>-</sup>), demora no processo de nodulação, ou troca na gama de hospedeiros. Alguns genes-*nod* são comuns (*nodABC*) em todos os rizóbios, portanto, a mutação desses genes elimina a produção de fatores de nodulação pelo microrganismo e suprime a capacidade de obter uma resposta da planta como a curvatura do pêlo da raiz, formação da infecção (Inf<sup>-</sup>), divisão da célula cortical, ou formação do nódulo. Outros genes-*nod* não são funcionais e/ou estruturalmente conservados em todos os rizóbios; esses são chamados de genes-*nod* hospedeiro-específicos, devido ao fato que mutações nesses genes resultam na modificação da faixa de hospedeiros,

apesar disso, esses mutantes ainda produzem fatores de nodulação, mas sua estrutura é alterada (PROMÈ; DEMONT, 1995; ROCHE, *et al.*, 1996).

A transcrição dos genes-*nod* comuns ou específicos, é controlada pela proteína regulatória NodD<sub>1</sub>, a qual é codificada pelos genes *nodD*<sub>1</sub> em *B. japonicum* (BROUGHTON *et al.*, 2000). Como pode ser observado na figura 1, as proteínas NodD<sub>1</sub> são ativadoras transcricionais que se ligam à região reguladora da transcrição *nod*-box e, conseqüentemente, ocorre a ativação da transcrição dos genes *nod*. Deste modo, essas proteínas requerem a presença de flavonóides para que possam ativar a expressão dos genes de nodulação comuns (*nodABC*) ou específicos (PROMÈ; DEMONT, 1995; ROCHE, *et al.*, 1996).



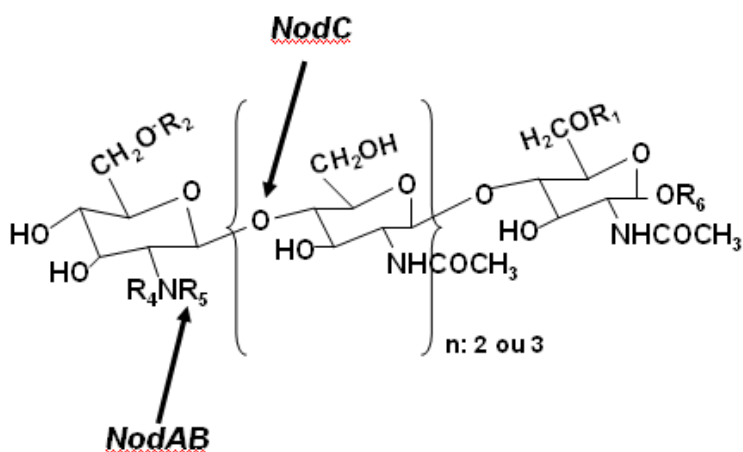
**Figura 1** – Indução da proteína NodD<sub>1</sub> em *B. japonicum* e transcrição dos genes de nodulação.

**Fonte:** Adaptado de Promè e Demont (1995).

A síntese da estrutura dos fatores de nodulação é realizada através do controle bioquímico da expressão dos genes *nodABC* que estão envolvidos na síntese de lipooligoquitina. Apenas com a expressão desses genes é possível sintetizar o esqueleto dos lipooligossacarídeos quitinos desprovidos de algumas substituições (PROMÈ; DEMONT, 1995).

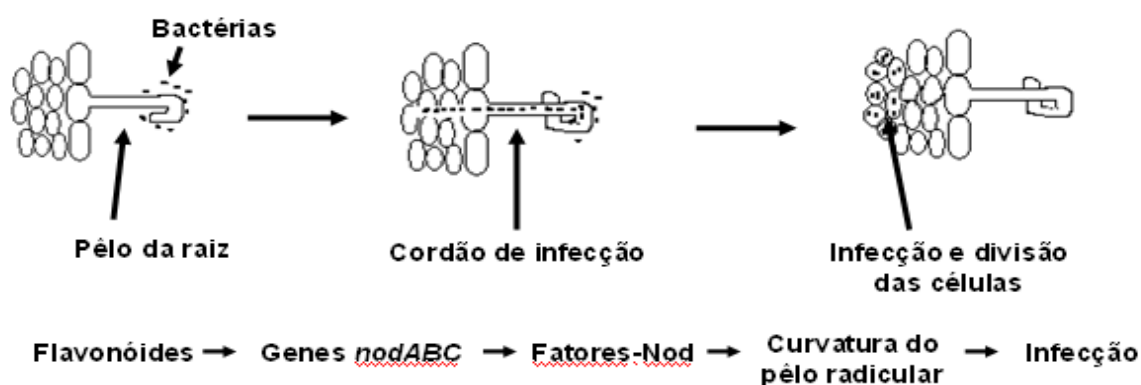
A proteína NodC, resultante da expressão do gene *nodC*, é uma N-acetilglucosaminil-transferase que sintetiza a cadeia principal do oligossacarídeo dos fatores de nodulação. Essa proteína está localizada na membrana citoplasmática

das bactérias. A proteína, resultante da expressão do *nodB*, tem a função de remover de forma seletiva um grupamento N-acetil na extremidade não redutora do quitooligômero, sendo encontrada no citoplasma ou na membrana do microrganismo. Já a função da NodA é provavelmente a de introduzir um grupo de ácido graxo no grupamento amino livre do quitooligômero mono-deacetilado (ROCHE, *et al.*, 1996)



**Figura 2** – Atuação das proteínas NodA, NodB e NodC na síntese dos fatores de nodulação  
**Fonte:** Adaptado de Promè e Demont (1995)

Os fatores de nodulação induzem na planta hospedeira várias respostas que incluem desde a deformação dos pelos radiculares, divisão da célula cortical e a formação do nódulo propriamente dito (Figura 3). Contudo, apenas os fatores de nodulação não são suficientes para garantir o sucesso da simbiose. Outros produtos provenientes dos rizóbios parecem ser necessários para continuar o desenvolvimento da infecção; entre esses compostos estão os exopolissacarídeos (EPS) e proteínas exportadas através do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) (BROUGHTON *et al.*, 2003; SAAD *et al.*, 2005).



**Figura 3** – Etapas do processo de infecção do pelo radicular.

#### 2.4 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III (SSTT) E O GENE *NOPP*

Por um longo período, foi assumido que bactérias Gram-negativas não secretavam proteínas no ambiente externo. Entretanto, pesquisas feitas há duas décadas revelaram que bactérias Gram-negativas transferem proteínas através de um mecanismo sofisticado denominados de sistemas de secreção. Hoje, já estão descritos alguns sistemas de secreção (CORNELIS, 2000).

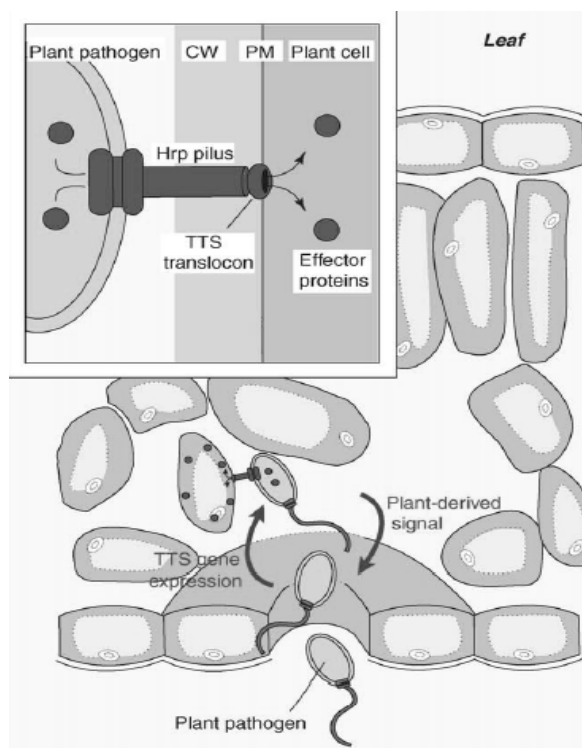
Sistemas de secreção são aparatos que possuem a função de secretar enzimas ou proteínas do microrganismo para o ambiente externo. Esses sistemas podem ser divididos em 5 grupos, de I a V. O Tipo I é conhecido por secretar toxinas, proteases e lipases, sendo responsável pelo transporte de proteínas diretamente do citoplasma para o meio extracelular, tendo como um exemplo a *Escherichia coli*. Já o Tipo II secreta exoenzimas, incluindo a celulase; como exemplo, esse sistema pode ser encontrado em *Xanthomonas axonopodis*. O Sistema de Secreção Tipo III (SSTT) presente, por exemplo, em *Rhizobium spp.*, e o tipo IV secretam proteínas que são injetadas para dentro das células hospedeiras. Um exemplo deste último é o presente em *Agrobacterium*, que injeta DNA diretamente no interior das células de plantas. Por último, no Tipo V, também conhecido como autotransportador, a proteína é liberada para o meio extracelular atravessando a membrana por auto-proteólise (DUONG; WICKNER, 1997; CORNELIS, 2000; REMAUT; WAKSMAN, 2004).

O SSTT está presente na maioria das bactérias Gram-negativas associadas a plantas e animais, e foi intensamente estudado em patógenos de animais como a *Yersinia*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* enteropatogênica, *Salmonella*, e patógenos de plantas como *Ralstonia solanacearum*, espécies de *Erwinia*, etc. Esse sistema também foi identificado em estirpes de bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio, dos gêneros *Rhizobium* (*Rhizobium* sp. NGR234), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, entre outros (BÜTTNER; BONAS, 2006; MAZURIER *et al.* 2006).

O SSTT consiste em um maquinário complexo que forma um aparato que atravessa a membrana da célula hospedeira e insere proteínas efetoras em seu citoplasma. É composto por mais de 20 proteínas, com um mínimo de nove componentes conservados entre bactérias patogênicas de animais e plantas, sugerindo que a arquitetura principal de sua estrutura é similar em diferentes espécies de bactérias. Esse sistema abrange ambas as membranas da bactéria, e está associado com um filamento extracelular chamado de “agulha” em patógenos de animais e “pili Hrp” (resposta hipersensitiva e patogênica) em patógenos de plantas. O “pili Hrp” é considerado tão longo quanto a “agulha” de patógenos de animais e serve como um dispositivo transportador de longa distância para a secreção de proteínas através da parede celular da planta. Os genes que codificam para essas proteínas são conhecidos como *hrp* (resposta hipersensitiva e patogênica) ou *hrc* (*hrp* conservado), no entanto, em rizóbios são chamados de *rhc* (*rhizobium* conservado). A expressão desses genes ocorre depois que a bactéria penetra na raiz da planta, em um estágio intermediário da simbiose, depois da expressão dos genes *nod* e antes da expressão dos genes envolvidos com a fixação do nitrogênio (*fix* e *nif*) (VIPREY *et al.*, 1998; BÜTTNER; BONAS, 2006).

Contudo, para que ocorra a translocação das proteínas efetoras através da membrana plasmática da planta é necessária a presença do “Translocon STT”, uma proteína canal indispensável para o transporte da proteína efetora na célula hospedeira; o esquema desse processo está disponível na figura 4 (BÜTTNER; BONAS, 2006).

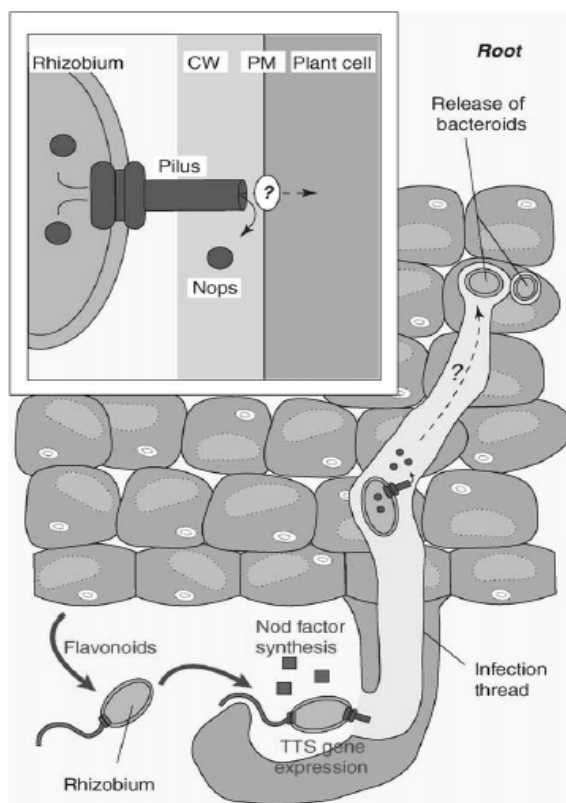
A primeira proteína proposta para o Translocon STT de uma planta foi a HrpF, representando um fator de patogenicidade essencial em *Xanthomonas campestris*; HrpF está presente em diferentes espécies de xantomonas, rizóbios, entre outros. (BÜTTNER; BONAS, 2006).



**Figura 4** – Esquema do Sistema de Secreção Tipo III (SSTT) durante a infecção do patógeno na planta

Fonte: Adaptado de Büttner e Bonas (2006)

As proteínas efetoras agem nas células do hospedeiro alterando seu metabolismo e causando a supressão das defesas basais contra o microrganismo. É provável que a supressão das defesas do hospedeiro seja uma função universal do SSTT em bactérias patogênicas. Em patógenos de animais, onde o SSTT foi extensivamente estudado, provou contribuir com patógenos que causam diferentes doenças com diferentes sintomas. As bactérias patogênicas secretam proteínas efetoras que alteram o funcionamento da célula, favorecendo a invasão bacteriana; são exemplos a *Yersinia* spp., cujas proteínas efetoras são conhecidas como YopO, YopE, etc., *Salmonella* spp. (SipB, SipC, etc), *Shigella* spp. (IpaA, IpaB, etc), *E. coli* (EspB, Tir, etc.), *Pseudomonas aeruginosa* (ExoS, ExoT, etc.), entre outras (CORNELIS, 2000; SKORPIL *et al.*, 2005; YIP; STRYNADKA, 2006). Em rizóbios, essas proteínas são conhecidas como Nops (“Nodulation outer proteins”) (Figura 5).



**Figura 5** – Esquema do Sistema de secreção Tipo III (SSTT) injetando proteínas efetoras (Nops) na planta hospedeira.

**Fonte:** Adaptado de Büttner e Bonas (2006).

As Nops possuem diferentes funções relacionadas ao SSTT, mas todas têm a mesma finalidade das proteínas efetoras de patógenos animais, ou seja, a supressão das defesas do organismo hospedeiro para que ocorra a infecção. Observou-se, em *Rhizobium* sp NGR234, que a presença ou ausência das Nops alterou drasticamente a capacidade de nodulação (SAAD *et al*, 2005).

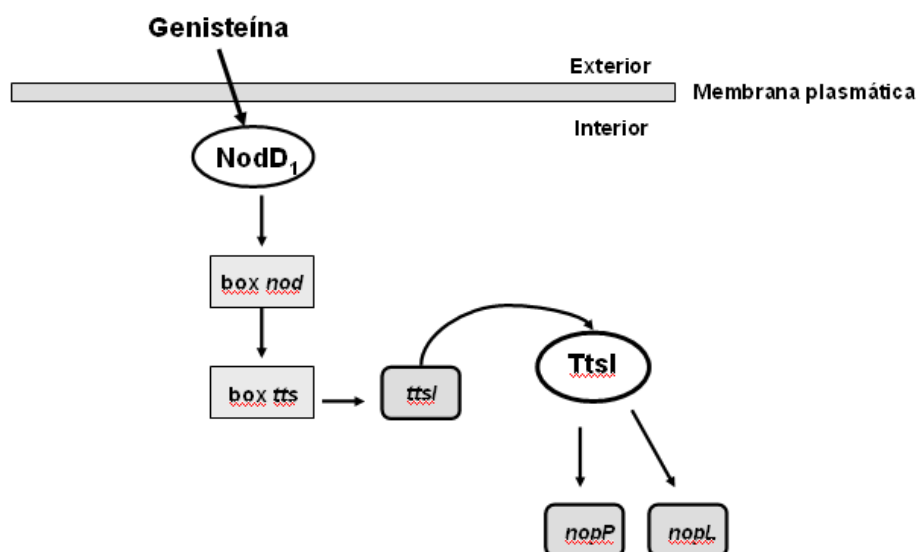
Em *Rhizobium* sp NGR234, a fosforilação da proteína NopL inibe uma enzima, MAP (proteína de atividade mitogênica), cuja função é reconhecer processos patogênicos na planta hospedeira e ativar genes de defesa da planta permitindo, deste modo, o desenvolvimento da infecção e do processo de nodulação (SKORPIL *et al.*, 2005).

A defesa contra a infecção por fitopatógenos em plantas se dá pela produção de compostos fenólicos, metabólitos secundários, barreiras físicas como a cutícula, etc., e, também, por uma resposta de genes que estão relacionados com a detecção do organismo invasor. Quando uma planta infectada é resistente ao

patógeno, ela reconhece proteínas codificadas pelos genes de avirulência (*Avr*) do invasor. Logo, genes de resistência da planta que reconhecem essas proteínas armam uma rápida resposta de defesa, entre elas a resposta de hipersensibilidade (HR), que leva à morte celular no ponto de infecção, impedindo que a doença se dissemine. Entretanto, quando o hospedeiro é sensível, não há reconhecimento das moléculas do patógeno, assim, este consegue invadir e parasitar a planta, como ocorre em bactérias simbióticas, provavelmente pela ação das proteínas Nops (ALFANO; COLLMER, 2004).

Em *Rhizobium* sp NGR234, foram identificadas as proteínas efetoras NopA, NopB, NopC, NopL, NopX e NopP, e seus respectivos genes. Já em *B. japonicum*, foram descritas as NopA, NopB, NopL e NopP e seus respectivos genes (SUB *et al.*, 2006).

Os genes envolvidos na transcrição das Nops são induzidos por flavonóides como a genisteína. Em *B. japonicum*, a cascata se inicia com a ativação da proteína NodD<sub>1</sub> por genisteína. A proteína NodD<sub>1</sub> ativada se liga ao *nod* box e, conseqüentemente, aciona o *tts* box, estimulando a expressão do gene *ttsI*. Este gene é essencial para a ativação do SSTT, por produzir a proteína TtsI, que se liga aos genes (*nopL*, *nopP*, etc.) que codificam proteínas efetoras (NopL, NopP, etc.), como pode ser observado na figura 6 (KRAUSE *et al.*, 2002; LANG *et al.*, 2008).



**Figura 6** – Cascata da ativação do box *tts* e dos genes *nopP* e *nopL* pela indução por genisteína.

**Fonte:** Adaptado de Krause *et al.* (2002)

Entretanto, o SSTT pode ser também ativado via outras proteínas, por um sistema conhecido como “dois-componentes” (*two component system*) (Krause *et al*, 2002).

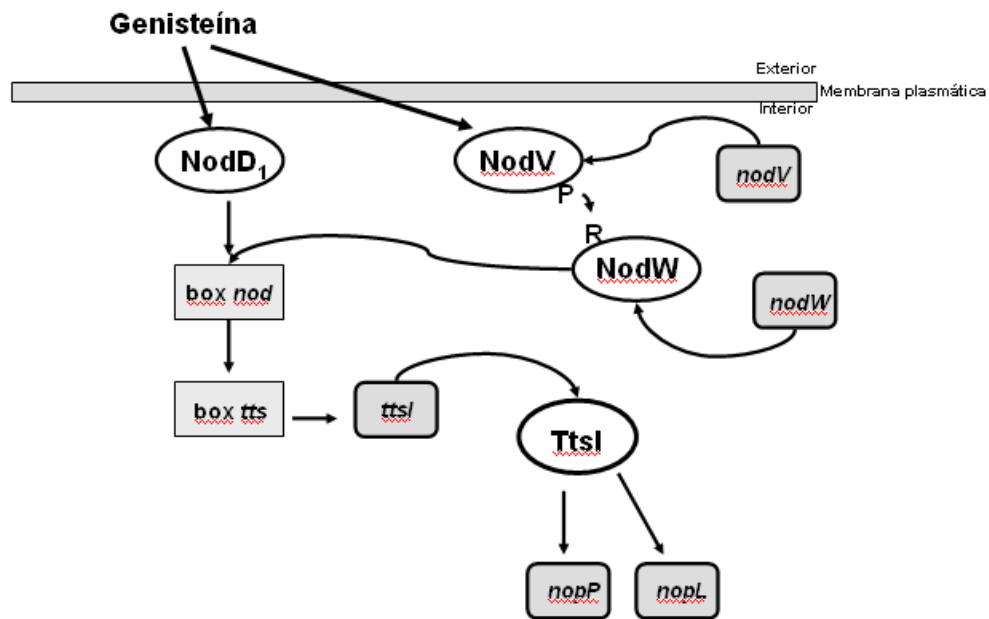
## 2.5 SISTEMA DE DOIS-COMPONENTES

A descrição do sistema de “dois-componentes” foi realizada primeiramente por Göttfert *et al* (1990), em seu trabalho com mutantes para os genes *nodV* e *nodW* em *B. japonicum*, no qual, observou que esses mutantes apresentaram o fenótipo de ausência de nódulos quando esses genes são interrompidos. Assim, verificou-se que esse sistema é essencial para a nodulação em *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, *Macroptilium atropurpureum*, porém, em soja causou somente um atraso no processo de nodulação.

Um segundo sistema de dois-componentes, NwsAB, está presente em *B. japonicum*. Desta forma, a função do *nodW* no processo de nodulação tem sido explicada pela mutação no gene *nwsB* – gene responsável pela codificação de uma proteína resposta reguladora necessária para a expressão completa do *operon nodYABC* de *B. japonicum*, que apresenta 65% de identidade com a NodW – poderia causar a super-expressão do gene *nodW* (LOH *et al.*, 2002).

Assim, o gene *nodW* detectado no seqüenciamento parcial do genoma de *B. japonicum* CPAC 15 por Godoy *et al.*, 2008, pode representar uma resposta-reguladora adicional que possui uma semelhança entre os sistemas NodVW e NwsAB.

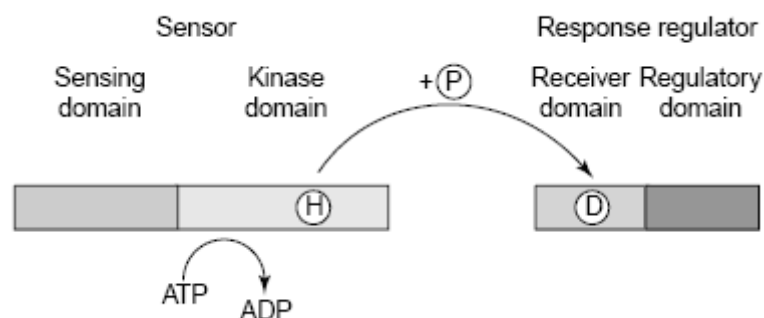
Em *B. japonicum*, os genes *nodV* e *nodW* codificam duas proteínas reguladoras identificadas como NodV e NodW, respectivamente. NodVW atuam regulando positivamente a expressão dos genes *nod* e dos genes relacionados ao sistema de secreção III, atuando diretamente nas regiões reguladoras box *nod* e ativando a transcrição do gene *ttsI* (SSTT), através da indução por flavonóides como a genisteína (LOH *et al*, 2002) (Figura 7).



**Figura 7** – Ativação das proteínas NodD<sub>1</sub>, NodV e NodW, *nod* box e do gene *ttsI* pela indução por genisteína.

Fonte: Adaptado de Krause *et al.*, (2002)

Desta forma esse sistema consiste de uma proteína sensora, ou histidina quinase (NodV), ligada à membrana da bactéria, e por uma proteína resposta-reguladora (NodW). Basicamente, o funcionamento dessas proteínas ocorre via uma série de passos de fosforilações. Inicia-se com a fosforilação da proteína NodV, devido à presença da genisteína. A proteína NodV utiliza ATP para se autofosforilar. Conseqüentemente, o fosfato resultante, contendo alta energia, é transferido para o aspartato presente na proteína reguladora (Figura 8), a NodW, alterando sua habilidade de se ligar à seqüência de DNA da região reguladora *nod* box (GROB *et al.*, 1994; BIJLSMA *et al.*, 2003).



**Figura 8** – Fosforilação da proteína sensora e reguladora do sistema de dois-componentes.  
**Fonte:** Adaptado de Bijlsma *et al.* (2003)

Assim, após a ativação do *nod* box ocorre a ativação dos genes do Sistema de Secreção do Tipo III, evidenciando a dependência do SSTT pelo sistema de dois-componentes (BIJLSMA *et al.*, 2003).

Neste contexto, o presente trabalho pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para seleção de estirpes mais eficientes e competitivas para o processo de FBN na soja, através do conhecimento da expressão dos genes relacionados com o processo de nodulação da *B. japonicum* CPAC 15 na presença de flavonóides de soja. Assim, o conhecimento da expressão do gene *nodC* (produção dos fatores de nodulação), do gene *nodW* (sistema de dois-componentes) e o gene *nopP* (codificação de proteínas efetoras necessárias no processo de infecção), podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias futuras, em que bactérias com maior expressão desses genes apresentam maior capacidade de nodulação.

### 3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes *nodW*, *nodC* e *nopP*, envolvidos com o processo de infecção e desenvolvimento dos nódulos de soja, na estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*, pela técnica de RT-qPCR em presença de indutores.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar *in vitro* a expressão por RT-qPCR dos genes *nodW*, *nodC* e *nopP*, na estirpe CPAC 15 de *B. japonicum* na presença de genisteína em diferentes tempos de indução de 15 min, 1 hora, 4 horas e 8 horas a partir da fase log de crescimento.

b) Analisar *in vitro* a expressão por RT-qPCR dos genes *nodW*, *nodC* e *nopP*, na estirpe CPAC 15 de *B. japonicum* crescidas na presença de genisteína (1 $\mu$ M) e de exsudato de semente de soja (1 $\mu$ M), por 48 h.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTIRPE DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

Foi utilizada a estirpe de *B. japonicum* CPAC 15 (=SEMIA 5079), microsimbionte da soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. A estirpe é utilizada em inoculantes comerciais no Brasil desde 1992, e não oferece risco para o meio ambiente e à saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1). A estirpe consta do banco de germoplasma de rizóbios da Embrapa Soja.

### 4.2 PREPARO DOS INDUTORES DOS GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE NODULAÇÃO

#### 4.2.1 Preparo da Genisteína

A solução estoque de genisteína (Sigma; Peso molecular = 270g) foi preparada na concentração final de 1000  $\mu\text{M}$ , a partir da dissolução de 0,0135g da mesma diluída em 50 mL de metanol. Para a indução dos genes na *B. japonicum* foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  da solução estoque em um volume de 200 mL de meio de cultura, obtendo uma concentração final de 1  $\mu\text{M}$  (Lang et.al, 2008).

#### 4.2.2 Obtenção e Preparo do Exsudato de Semente de Soja

O exsudato de semente de soja foi preparado segundo Hungria *et al* (1991). O teor aproximado de genisteína foi calculado pelo coeficiente de extinção da genisteína ( $\log \varepsilon = 4,50$  a 263 nm), após leitura da densidade óptica do extrato a 263 nm. Assim, foi determinada a concentração de 22,3  $\mu\text{M}$  de genisteína na diluição de 1:10 de exsudato em água. Para a indução dos genes na *B. japonicum*

foram utilizados 890  $\mu\text{L}$  do exsudato em um volume de 200 mL de meio de cultura, obtendo uma concentração final de 1  $\mu\text{M}$ , segundo Hungria *et al.* (1991).

#### 4.3 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA NODULAÇÃO PELA GENISTEÍNA NOS TEMPOS INICIAIS DE NODULAÇÃO

O experimento seguiu um delineamento em blocos ao acaso com três réplicas como blocos e com uma estrutura de tratamento em fatorial, com dois fatores de tratamento: tempo (15min, 1h, 4h e 8h) e o tipo de indutor (genisteína ou metanol). Como controle para o tratamento com genisteína foi utilizado o metanol. Assim, foi inoculada a estirpe *B. japonicum* CPAC 15 em 10 mL de meio TY (triptona, extrato de levedura e cloreto de cálcio) líquido (pré-inóculo), mantendo-se sob agitação a 28°C por, aproximadamente, 72 horas. Dois mL do pré-inóculo foram inoculados em 200 mL de meio TY líquido, a cultura foi mantida sob agitação a 28°C por aproximadamente 48 horas (até a fase exponencial de crescimento). Em seguida, foi adicionada genisteína (Sigma) na concentração final de 1  $\mu\text{M}$  (Lang *et al.*, 2008), dissolvida em 200  $\mu\text{L}$  de metanol. Após a adição da genisteína, foram realizadas as extrações de RNA após os períodos de incubação, e os níveis de expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* foram avaliados pela técnica de RT-qPCR.

#### 4.4 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA NODULAÇÃO PELA GENISTEÍNA E EXSUDATO DE SEMENTE DE SOJA

O experimento seguiu um delineamento em blocos ao acaso com três réplicas como blocos e quatro tratamentos. Uma cultura de *B. japonicum* CPAC 15 foi inoculada em 10 mL de meio TY líquido (pré-inóculo), mantendo-se sob agitação a 28°C por, aproximadamente 72 horas. Dois mL do pré-inóculo foram inoculados em 200 mL de meio TY líquido e, para a indução da expressão dos genes, foram adicionados indutores (genisteína e exsudatos de sementes de soja) a

cada cultura. Foram utilizados quatro tratamentos: 1) cultura com genisteína (1 $\mu$ M); 2) cultura com metanol (controle da genisteína); 3) cultura com exsudato (1 $\mu$ M de genisteína); 4) cultura com água (controle do exsudato). A cultura foi mantida sob agitação a 28°C por aproximadamente 48 horas (até a fase exponencial de crescimento), em seguida procedeu-se a extração do RNA.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DO RNA

A extração do RNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Farrell (1996). Para a extração do RNA procedeu-se à centrifugação da cultura a 10.000 *g* por 10 min. Ao *pellet* formado foram adicionados 3,0 mL de tampão de lise NP-40 (75% NP-40; sacarose 0,25 M; 0,02 M EDTA) e 4 mL de tampão acetato de potássio (3 M acetato de potássio; 10 g tiocianato de guanidina) e incubado no gelo por 10 min. A suspensão celular foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi incubado por 15 min no gelo, seguido de outra centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de clorofórmio e álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizado gentilmente. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 10.000 *g* por 3 min para separar as fases. À fase aquosa foi adicionado 0,6 do volume de isopropanol e estocado a -20°C por 20 min, para precipitação do RNA. O RNA foi coletado após a centrifugação a 10.000 *g* por 10 min, em seguida o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70%. Por último, o RNA foi seco em estufa a 37°C e ressuspendido em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato 0,1% v/v).

#### 4.6 TRATAMENTO COM DNASE

O RNA extraído foi analisado no espectrofotômetro NanoDrop® ND – 1000 (Thermo Fischer Scientific), a fim de verificar a quantidade e qualidade do mesmo. Em um passo seguinte, o RNA foi tratado com a enzima RNase-free DNase (Qiagen) para eliminar qualquer contaminação por DNA, na concentração de 2 U

para cada 1.000 ng de RNA. A reação foi incubada por 8 min a 37°C e interrompida com choque térmico a 60°C por 5 min.

#### 4.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Para as reações de transcrição reversa (síntese da 1ª fita de cDNA) foi utilizado o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante.

#### 4.8 DESENHO DOS PRIMERS PARA O PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Para o desenho dos *primers*, foram utilizadas seqüências dos genes provenientes da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* depositadas no banco de dados *Genbank - National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o software *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), obtendo fragmentos de tamanho entre 50 e 150 pares de bases. As seqüências de *primers* para os genes analisados neste trabalho, além do gene utilizado como normalizador, 16S rRNA, estão dispostas no quadro 2.

**Quadro 2** – Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

<b>Genes</b>	<b>Sequência dos <i>primers</i></b>
<i>nopP</i>	F.5'TGGAGATATAGGGATGGTGAATGG3'
	R.5'ATCGCTCGACGCTTTGGA3'
<i>nodW</i>	F.5'CGAGATCACCGTCAAATTCAC3'
	R. 5'GAACGAGGTCGGCCAGAGA3'
<i>nodC</i>	F. 5'CACCAGGGTATAGAGCCATCGA3'
	R.5'ATTGCTCCTCGCCATTTTCAT3'
16S rRNA	F.5'CAAGCGGTGGAGCATGTG3'
	R.5'GGACATGTCAAGGGCTGGTAA3'

#### 4.9 RT-QPCR

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas no termociclador ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para realizar as reações de RT-qPCR foi usado o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante.

A eficiência da reação de amplificação para cada par de *primers* dos genes estudados e do normalizador foi estimada através de uma série de diluições do cDNA ( $10^0$  a  $10^{-10}$ ), onde foram testadas diferentes concentrações de *primers* (0,1  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 0,32  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M). Os valores de Ct obtidos foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema de acordo com a fórmula  $E=[10^{-1/\text{slope}}]-1$ . Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram: ativação da enzima “hotstar” a 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg para o anelamento e extensão a 60°C por 1 min, sendo coletados os dados nesta última etapa. Adicionalmente foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1°C/min para a construção da curva de dissociação. Considerando que os fragmentos

gerados apresentam temperatura de desnaturação específica é possível detectar a presença de amplificação inespecífica em uma mesma reação.

A reação de quantificação relativa foi realizada utilizando as seguintes quantidades para cada reação: gene normalizador: 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2X (composto pelas enzimas uracil N-glicosilase e AmpliTaq Gold, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, KCl e o fluoróforo SYBR green); 1,0 µL (0,4 µM) de cada *primer* R e F; 2,5 µL de cDNA e 8 µL de água milliQ; genes alvos: 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2X; 0,8 µL (0,32 µM) de cada *primer* R e F; 2,5 µL de cDNA e 8,4 µL de água milliQ. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 2 min, 60°C por 1 min, sendo coletados os dados nesta última etapa, além de uma etapa final que incluiu a curva de dissociação para verificar amplificação inespecífica.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para cada tratamento foi detectado o valor de Ct (*Cycle threshold*), tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Assim, obtém-se o valor de  $\Delta Ct$ . O valor de  $\Delta Ct$  dos tratamentos é subtraído do valor do  $\Delta Ct$  da amostra controle (calibrador), encontrando o valor de  $\Delta\Delta Ct$ . Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A placa de PCR para a quantificação relativa foi montada em triplicata, com três repetições biológicas para cada gene e tratamento estudado.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita por estatística descritiva. A reprodutibilidade e precisão dos valores de RQ obtidos foram estimados pelos desvios padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) em cada corrida e entre as

corridas. Os tempos onde foram detectados maiores diferenças de RQ entre os tratamentos, os mesmos foram avaliados pelo Teste T.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC*, *NODW* E *NOPP* NOS TEMPOS INICIAIS DE NODULAÇÃO APÓS A INDUÇÃO COM O FLAVONÓIDE GENISTEÍNA

A expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* foi analisada na estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*, através da técnica do RT-qPCR, utilizando o flavonóide genisteína como indutor, sendo a estirpe induzida a partir da fase log de crescimento nos tempos de 15 min, 1 h, 4 h e 8 h.

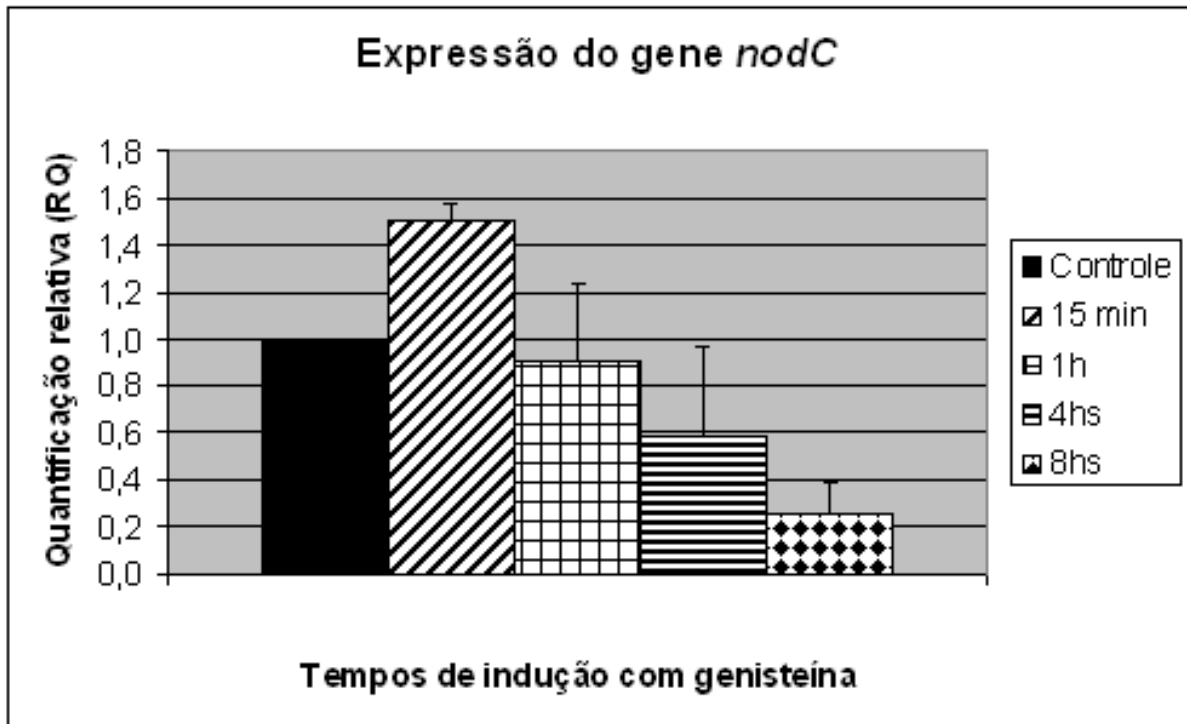
Os valores da quantificação relativa (RQ), desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV) para o gene *nodC*, *nodW* e *nopP* estão apresentados na Tabela 1. A variação dos níveis de expressão de cada gene comparado ao calibrador, nos diferentes tempos de indução, podem ser visualizados nas figuras 9, 10 e 11.

**Tabela 1** - Quantificação relativa do gene *nodC*, *nodW* e *nopP* em diferentes tempos de indução por genisteína<sup>1</sup>. O tratamento metanol foi utilizado como controle, e utilizado como normalizador nas reações de RT-qPCR.

Gene	Tempos de indução	Run	RQ/Run	RQMax	RQMin	Média RQ	SD geral	%CV	
Gene <i>nodC</i>	15 min	1	1,432	1,505	1,362	1,51	0,076	5,06	
		2	1,578	1,826	1,365				
		3	1,540	1,716	1,382				
	1 h	1	1,114	1,143	1,085	0,89	0,335	37,37	
		2	0,511	0,523	0,499				
		3	1,067	1,106	1,030				
	4 h	1	0,859	0,922	0,801	0,58	0,388	66,38	
		3	0,310	0,344	0,280				
	8 h	1	0,153	0,158	0,149	0,25	0,136	54,64	
		2	0,346	0,366	0,327				
	Gene <i>nodW</i>	15 min	1	1,663	1,782	1,552	1,677	0,029	1,72
			2	1,711	2,050	1,427			
3			1,658	1,878	1,463				
1 h		1	1,058	1,090	1,028	1,025	0,047	4,58	
		3	0,992	1,024	0,961				
4 h		1	0,726	0,800	0,659	0,487	0,338	69,29	
		3	0,249	0,272	0,227				
8 h		1	0,252	0,241	0,264	0,323	0,100	30,91	
		2	0,394	0,420	0,369				
Gene <i>nopP</i>		15 min	1	0,791	0,857	0,730	1,417	0,542	38,25
			2	1,720	2,088	1,417			
			3	1,739	1,980	1,528			
	1 h	1	0,934	0,997	0,874	0,958	0,035	3,63	
		2	*	*	*				
		3	0,983	1,024	0,943				
	4 h	1	0,509	0,562	0,462	0,430	0,112	25,98	
		2	*	*	*				
	8 h	1	0,351	0,384	0,321	0,327	0,105	32,12	
		2	0,253	0,261	0,245				
			2	0,401	0,424	0,380			

<sup>1</sup> Os dados apresentados são os valores de de RQ de cada corrida, o RQ máximo e o RQ mínimo, médias de três repetições independentes, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV). Os valores de RQ são calculados pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta Ct$  do controle metanol ou água.

“\*” Dados perdidos;



**Figura 9** – Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

O gene *nodC* apresentou aumento na expressão no tempo de 15 min quando induzido com genisteína sendo 1,5 vezes mais expresso ( $p > 0,37$  pelo teste t) que o controle (metanol) (figura 9), indicando uma leve indução deste gene nos tempos avaliados quando em contato com o flavonóide genisteína. Após o tempo de 15 min, pode se observar uma queda na expressão do gene no decorrer dos tempos de indução (1 h, 4 h e 8 h), apesar do valor do %CV e SD serem altos, o que se deve a variabilidade dos valores de RQ obtidos nas repetições realizadas (tabela 1).

O mesmo perfil de expressão no decorrer dos tempos avaliados pode ser observado para os genes *nodW* e *nopP* sob indução com genisteína, conforme apresentado na tabela 1 e figuras 10 e 11, respectivamente.

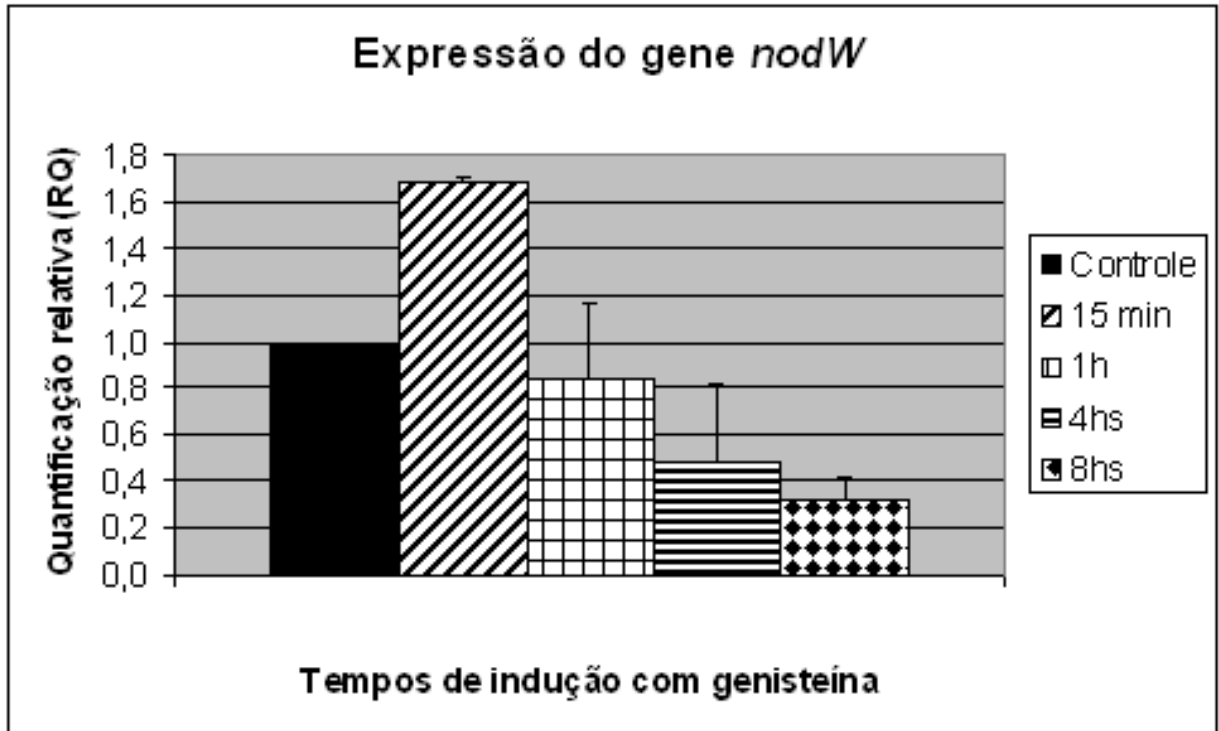
Proteínas necessárias para funções básicas como a síntese da cadeia principal dos fatores de nodulação, são codificadas pelos genes *nod* como,

por exemplo, uma N-acetilglucosaminil-transferase resultante da expressão do gene *nodC* (Roche *et al.*, 1996). Os fatores de nodulação são as moléculas secretadas pelo simbiote capazes de causar alterações morfológicas na raiz da planta hospedeira, levando ao processo de infecção e consequente formação do nódulo (BROUGHTON *et al.*, 2000).

Segundo Promè e Demont (1995), os genes *nod* são transcritos quando indutores, em geral flavonóides, ativam a proteína regulatória NodD<sub>1</sub>; esta proteína, por sua vez, se liga à região reguladora do *nod*-box, promovendo a transcrição dos genes de nodulação (*nodABC*), essenciais para o desenvolvimento do nódulo.

Em trabalho de Ausmees *et al* (2004), ao caracterizar a proteína NopP em *Rhizobium* sp. NGR234, relataram que genes do *nodABC* são transcritos em poucos minutos após a indução por flavonóide por participarem da fase inicial do processo de nodulação. Além disso, Viprey *et al* (1998), trabalhando com sistema de secreção tipo III em *Rhizobium*, descreveram que genes do operon *nodABC* possuem maior expressão no período anterior a 1 h de indução pelo flavonóide.

Perret *et al.* (1999), em um estudo sobre a análise transcricional do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium* NGR234, analisaram a expressão de genes do *nodABC*, após a indução por daidzeína através de hibridização com RNA marcado, e verificaram que genes envolvidos na síntese e secreção dos fatores de nodulação reagiram no máximo em 60 min após a indução e depois houve declínio na taxa de expressão. Neste estudo com o gene *nodC* houve um aumento da expressão no tempo de 15 min após a indução com a genisteína enquanto que para os demais tempos não houve expressão comparado com o calibrador, o que pode ser devido ao fato desse gene ser necessário no processo inicial da nodulação como já descrito por outros autores, ou seja logo após o contato com o flavonóide.

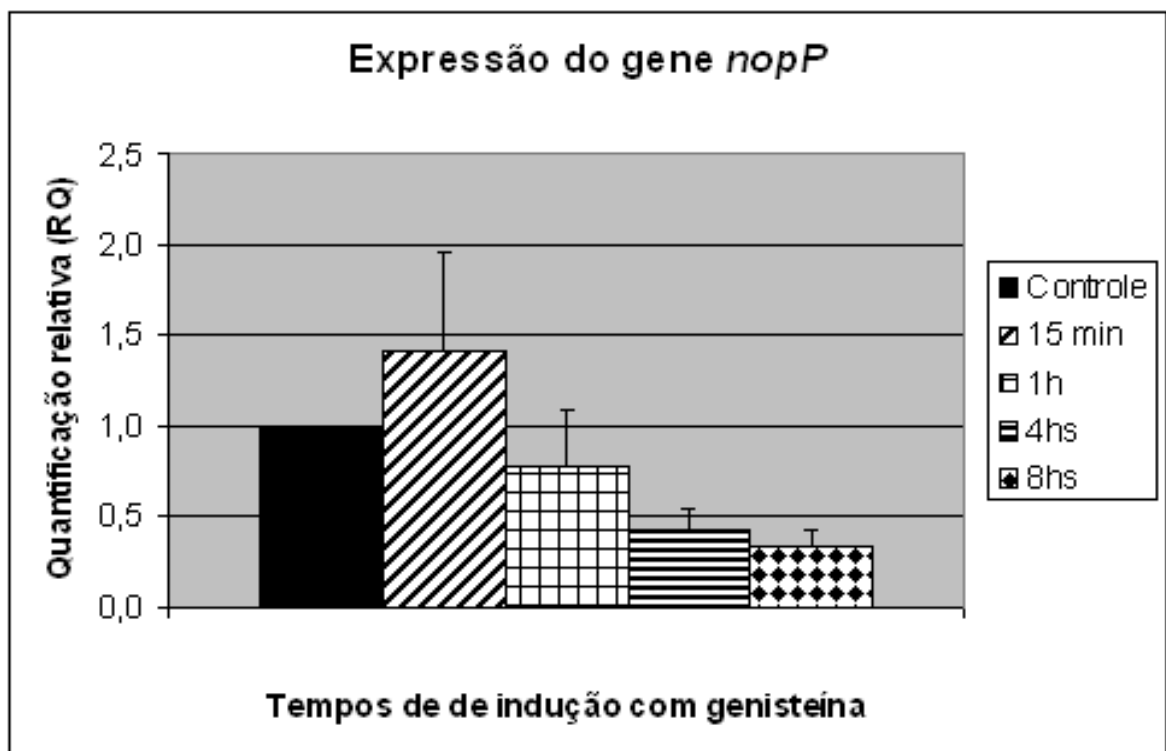


**Figura 10** – Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

De acordo com Loh *et al.* (2002), o gene *nodW*, codifica a proteína NodW, que faz parte do sistema dois-componentes, um sistema regulatório composto pelas proteínas NodV (proteína sensora) e NodW (proteína reguladora). A proteína NodV, de expressão constitutiva, na presença do indutor (genisteína), se autofosforila, e transfere o grupo fosfato à proteína NodW, alterando sua capacidade de se ligar à região reguladora dos genes *nod* e ativando a expressão do *nodABC* (BIJILSMA *et al.*,2003; LOH *et al.*, 1997).

Wei *et al* (2008), em um estudo de expressão gênica em *B. japonicum* USDA110 utilizando genisteína e exsudato de semente de soja como indutor, reportaram que os genes *nodW* e *nodV* e o operon dos genes *nod* são ativados quando na presença de genisteína no estágio inicial do processo de nodulação. Além disso, de acordo com seus resultados, o nível de expressão para o

gene *nodW*, quando induzido tanto com genisteína como com exsudato de semente de soja, é aumentado no tempo de 30 min após indução, porém o maior nível de expressão foi detectado no tempo de 6 h. No entanto, neste experimento também foi reportado o aumento da expressão no tempo de 15 min após a indução com genisteína, enquanto que nos tempos posteriores houve redução da expressão do gene, similares aos resultados obtidos neste trabalho para os três genes avaliados a partir da presença do indutor em meio contendo os microorganismos na fase log de crescimento, esse resultado apresentado pode ser devido ao gene *nodW* atuar no início da cascata de ativação dos genes relacionados ao processo de nodulação, codificando para uma proteína reguladora dos genes *nodABC*, assim a redução na expressão do gene pode ser devido a proteína ter sido codificada em níveis suficientes para o processo.



**Figura 11** – Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

O gene *nopP* codifica para uma proteína efetora do sistema de secreção do tipo III, a NopP, caracterizada inicialmente em *Rhizobium sp* NGR 234 (SAAD *et al.*, 2005). As proteínas efetoras atuam suprimindo as defesas do hospedeiro por inibir a resposta de hipersensibilidade e, desse modo, auxiliando no desenvolvimento da infecção (SAAD *et al.*, 2005).

Segundo Ausmees *et al.* (2004), em seu trabalho sobre a caracterização da proteína NopP em *Rhizobium sp.* NGR234, confirmaram, através de “SDS-PAGE” em mutantes para o gene *nopP*, que a secreção da NopP é dependente da presença de flavonóides e do SSTT, e que a transcrição dos genes relacionados com o SSTT ocorre várias horas depois da indução com o flavonóide.

Viprey *et al* (1998), mostraram com indução gênica em *Rhizobium sp.* NGR234 por daidzeína, que a expressão dos genes do SSTT é tardia quando comparada à expressão dos genes de nodulação. Nesse estudo, após 1 h de indução, os genes do SSTT foram pouco expressos, entretanto os genes *nod* envolvidos na síntese e modificação dos fatores de nodulação foram ativamente transcritos nesse tempo. Entretanto, após um dia a indução essa situação foi revertida, e os genes relacionados ao SSTT foram transcritos enquanto que muitos genes de nodulação são reprimidos. Contudo, neste trabalho, a expressão do gene *nopP* devido ao SD e %CV pode não ter sido aumentada em relação ao controle (metanol) para o tempo de 15 min, sugerindo que a expressão desse gene seria maior após um período mais longo de indução não avaliado neste trabalho.

## 5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC*, *NODW* E *NOPP* SOB INDUÇÃO DE GENISTEÍNA E EXSUDATO DE SEMENTE DE SOJA

Nesse segundo estudo, a expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* foi analisada na estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*, através da técnica do RT-qPCR, utilizando, como indutores de expressão, o flavonóide genisteína e exsudatos produzidos a partir de sementes de soja. A cultura de CPAC 15 cresceu na presença dos indutores por, aproximadamente, 48 h.

Os valores da quantificação relativa (RQ), desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV) são apresentados na tabela 4 para os genes *nodC*, *nodW* e *nopP* respectivamente.

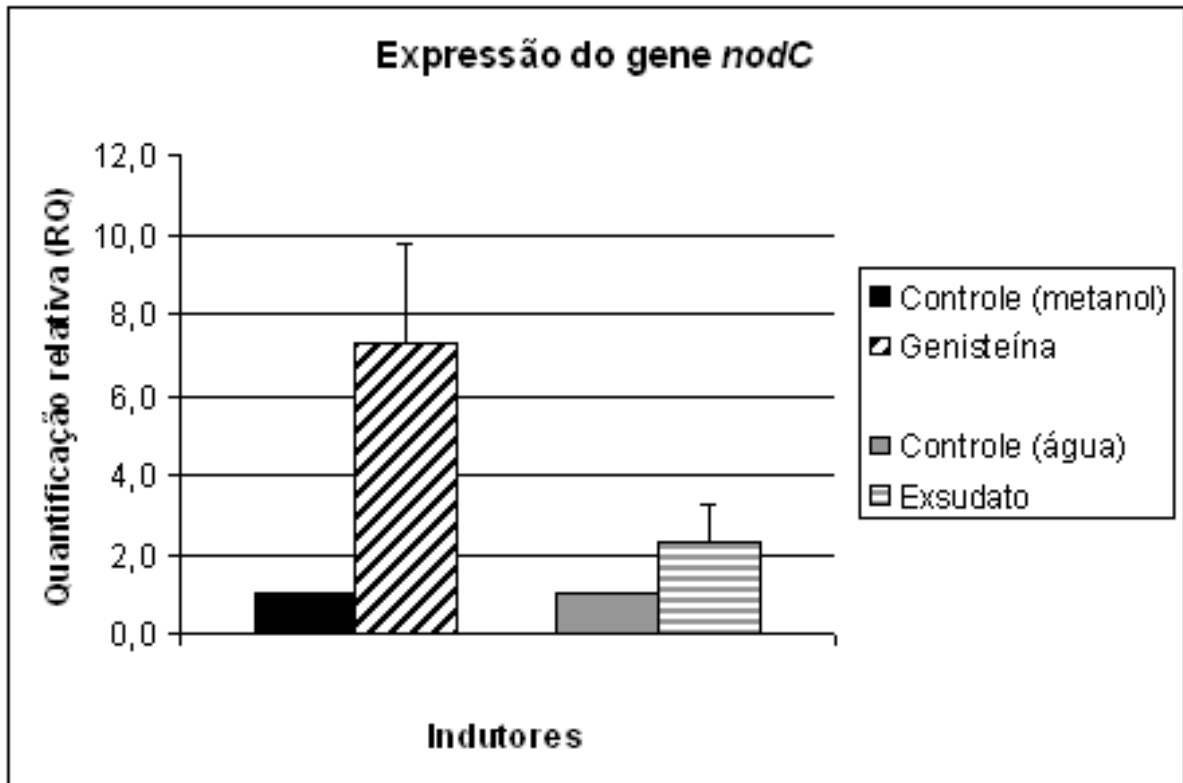
**Tabela 2** – Análise da expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* com genisteína e exsudato de semente de soja<sup>1</sup>.

Genes	Tratamentos	Run	RQ/Run	RQMax	RQMin	Média RQ	SD geral	%CV
<i>nodC</i>	Genisteína	1	4,984	5,311	4,677	7,297	2,465	33,788
		2	9,891	11,524	8,490			
		3	7,017	7,585	6,491			
	Exsudato	1	3,299	3,392	3,210	2,324	0,912	39,244
		2	2,181	2,321	2,050			
		3	1,492	1,515	1,470			
<i>nodW</i>	Genisteína	1	*	*	*	6,545	0,071	1,092
		2	6,494	7,426	5,679			
		3	6,595	7,246	6,003			
	Exsudato	1	2,226	2,409	2,057	2,042	0,568	27,845
		2	2,497	2,818	2,213			
		3	1,405	1,466	1,346			
<i>nopP</i>	Genisteína	1	8,223	8,672	7,797	7,853	0,522	6,649
		2	*	*	*			
		3	7,484	8,104	6,912			
	Exsudato	1	2,296	2,480	2,126	2,652	1,171	44,179
		2	3,961	7,694	2,040			
		3	1,700	1,893	1,527			

<sup>1</sup>Os dados apresentados são os valores de de RQ de cada *Run*, o RQ máximo e o RQ mínimo, médias de três repetições independentes, o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (%CV). Os valores de RQ são calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína ou exsudato de semente de soja subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol ou água respectivamente. Os valores de algumas repetições foram excluídos por não se enquadrarem nos valores obtidos das outras repetições.

“\* Dados perdidos;

O perfil dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* sob indução com ginesteína e exudato, conforme apresentado na tabela 2, pode ser observado nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente.



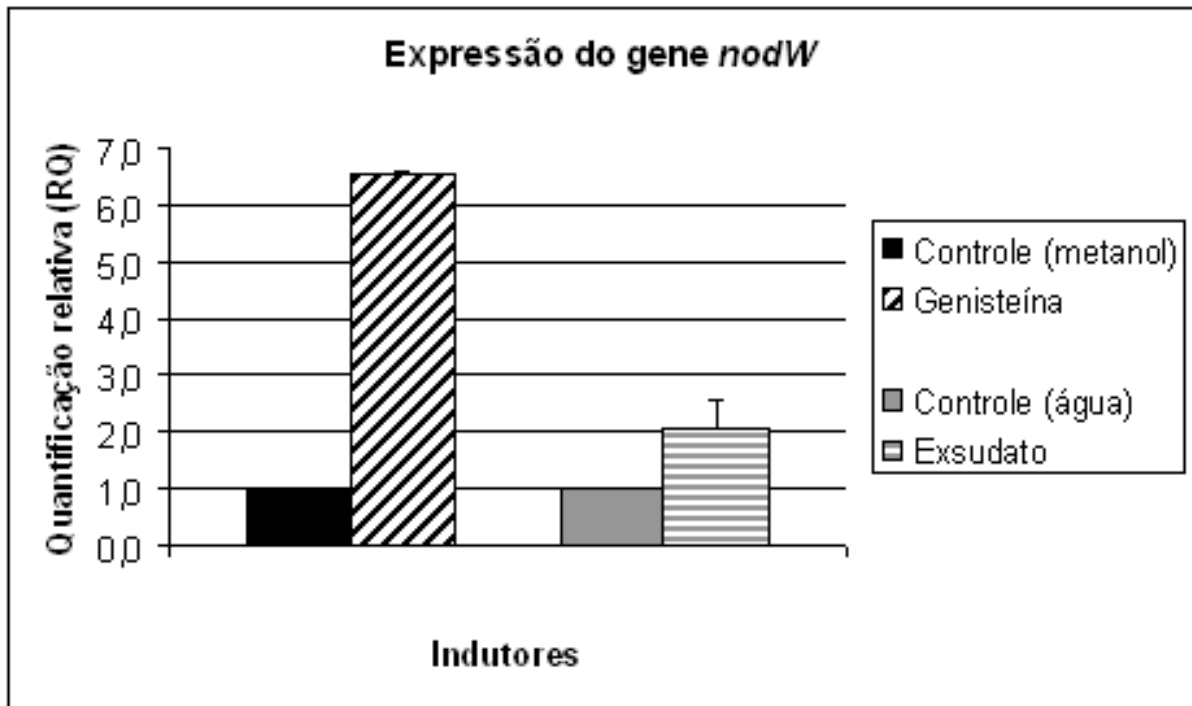
**Figura 12** – Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) na presença de ginesteína e exudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com ginesteína (1 $\mu$ M) e de crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com ginesteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol e o mesmo foi realizado para o tratamento com exsudato e o controle água. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

Conforme pode ser verificado na figura 12, o gene *nodC* apresentou um acréscimo de 7,29 vezes em sua expressão ( $p > 0,07$ ) na presença de ginesteína quando comparado ao controle (metanol). De modo similar, a indução com exsudato com semente de soja também levou a um aumento na expressão do gene em relação ao controle (água), apesar dos valores de %CV altos, devido à variabilidade dos valores de RQ obtidos nas repetições realizadas (tabela 2).

Kosslak e colaboradores (1987) ao analisarem a com indução de gene *nod* em *B. japonicum* com exsudato de semente de soja relataram primeiramente que os flavonóides extraídos da soja induzem os genes de nodulação em *B. japonicum*, além disso, identificaram através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) que a daidzeína e genisteína são os principais compostos presentes em extrato de raiz de soja responsáveis por induzir genes de nodulação em *B. japonicum*.

Além de flavonóides como a genisteína e daidzeína induzirem genes de nodulação, a isoliquiritigenina também induz esses genes (García *et al*, 2001), além de outros compostos não-flavonóides como betaínas e xantonas de acordo com Subramanian *et al* (2007). De acordo com o resultado obtido neste trabalho, o gene *nodC* apresentou um aumento na expressão quando induzido por genisteína, sendo este resultado esperado pois de acordo com Viprey *et al* (1998), genes do *nodABC* tem sua expressão aumentada na presença de flavonóides.

Trabalhando com expressão gênica em *B. japonicum* USDA110, Wei *et al* (2008), utilizaram exsudato de semente de soja e genisteína como indutor de genes, e demonstraram aumento semelhante na expressão do gene *nodC* tanto na presença do exsudato como de genisteína, contudo neste estudo observa-se que houve maior expressão do gene quando as bactérias foram crescidas na presença de genisteína em relação a seu controle, do que na presença do exsudato, o que pode ser explicado devido a diferença na concentração desta no exsudato. Embora tenha sido estimada a concentração de ginesteína presente no exsudado de sementes de soja, outros compostos presentes no exsudato podem ser detectados no mesmo comprimento de onda que a ginesteína, o que pode ter levada a uma superestimativa da quantidade deste flavonóide presente. De modo similar, é possível ainda a ocorrência de interação entre compostos presentes no exsudato causando essa diferença na eficiência de indução.



**Figura 13** – Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) na presença de genisteína e exsudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M) e de crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol e o mesmo foi realizado para o tratamento com exsudato e o controle água. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

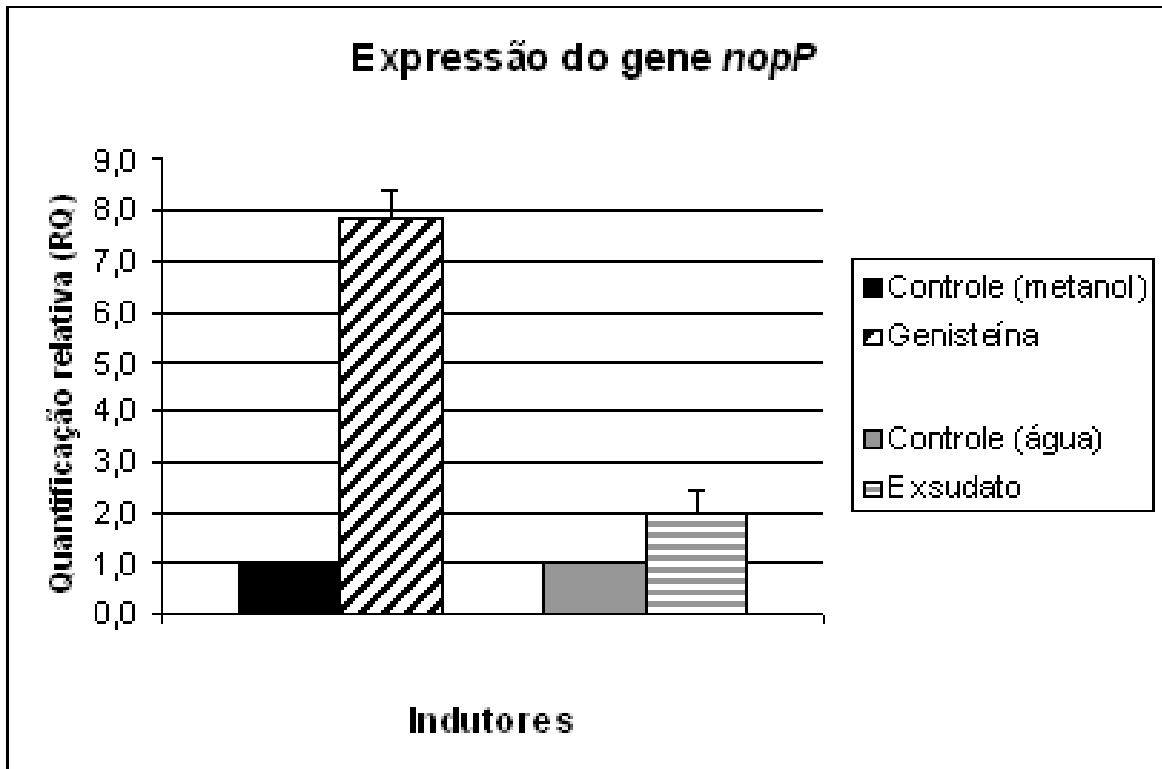
Observando a figura 13, nota-se que houve aumento no nível de expressão do gene *nodW* induzido com genisteína, sendo 6,54 vezes ( $p > 0,11$ ) mais expresso que o controle (metanol). Quando o gene foi induzido com exsudato de semente de soja também houve um aumento na expressão, embora com elevados valores de %CV (tabela 2).

A proteína resultante da expressão do gene *nodW*, presente em *B. japonicum*, é ativada após a fosforilação da proteína sensora NodV que detecta o flavonóide genisteína e autofosforila. Após a ativação da proteína NodW, esta se liga a região promotora dos genes *nod* resultando na expressão dos genes *nodABC* (LOH *et al.*, 2003).

Lang *et al* (2008), trabalhando com indução por genisteína em *B. japonicum*, analisaram a expressão do gene *nodW* através de “microarray” e relataram um aumento na expressão do gene na presença de genisteína devido a proteína NodW ser ativada pela mesma, semelhantemente ao resultado deste trabalho em que através de RT-qPCR, o gene *nodW* induzido por genisteína teve sua expressão aumentada.

Em trabalho de Wei e colaboradores (2008), foi analisada, em *B. japonicum* USDA110, a expressão de genes de nodulação e outros por RT-qPCR, utilizando como indutor exsudato de semente de soja e também genisteína, demonstraram aumento semelhante na expressão do gene *nodW* na presença dos dois tratamentos porém, neste estudo o gene apresentou um aumento no nível de expressão na presença de genisteína superior ao do exsudato comparado com seu controle e assim como já discutido para o gene *nodC* pode ter ocorrido também para o gene *nodW*.

García *et al.* (2001) descreveram que algumas cultivares possuem um “estoque” baixo de flavonóides, portanto a inclusão desses compostos no meio de cultura das bactérias poderia ser uma importante alternativa para a produção de inoculantes de melhor qualidade, facilitando a expressão dos genes de nodulação nas bactérias microssimbiontes.



**Figura 14** – Expressão do gene *nodP* de *B. japonicum* (CPAC 15) na presença de genisteína e exsudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M) e de crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16SrRNA. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16SrRNA) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol e o mesmo foi realizado para o tratamento com exsudato e o controle água. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão.

Analisando o resultado da expressão do gene *nodP*, no tratamento com genisteína pode-se verificar que houve um aumento na expressão do gene, sendo este 7,45 vezes mais expresso que o controle ( $p > 0,06$ ) (Figura 14). Para o tratamento com exsudato de semente de soja o gene *nodP* também teve aumento no nível de expressão, embora tenha apresentado um %CV alto (tabela 2).

A ativação do gene *nodP* acontece através de uma cascata, começando com o acionamento da proteína NodD<sub>1</sub> pelo flavonóide, que se liga ao *nod* box e ativa os genes *nodABC* e o box *tts*, que codifica para a proteína TtsI, cuja função é ativar a expressão do gene *nodP* (Krause *et al.*, 2002). Além da expressão do *nodP* “via NodD<sub>1</sub>”, esse gene pode ser acionado através do sistema de dois-

componentes, quando a proteína reguladora NodW se liga ao *nod* box desencadeando a mesma cascata até a ativação do gene *nopP* (LOH *et al.*, 2002).

Segundo Süb *et al* (2006), em rizóbios a secreção de proteínas pelo SSTT necessita de indução por flavonóides, além disso em seu estudo, identificaram proteínas extracelulares induzidas por genisteína em *B. japonicum*, através de eletroforese em gel de duas dimensões (2D-PAGE) e espectrofotometria de massa, no qual foi encontrada uma proteína similar a NopP da *Rhizobium* NGR234. Neste trabalho observa-se um aumento na expressão do gene que codifica para a proteína NopP quando a bactéria em crescimento na presença de genisteína, indicando que esta induz a expressão de genes relacionados ao SSTT.

Como já citado em Wei *et al* (2008) além de avaliarem a expressão dos genes *nodC* e *nodW*, também analisaram a expressão de genes relacionados ao SSTT na presença de genisteína e exsudato de semente de soja em diferentes tempos de indução, o qual relataram aumento na expressão do gene *TtsI* tanto na presença de genisteína quanto do exsudato, porém em proporções diferentes, sendo que nas primeiras horas 6 h houve maior expressão com genisteína e para o tempo de 12 h ocorre o contrário.

O gene *ttsI* participa da cascata para a ativação do gene *nopP*, conseqüentemente a expressão do gene *nopP* poderia aumentar na presença de flavonóides. Assim como pode ser observado na figura 14 houve um aumento na expressão do gene *nopP* na presença de genisteína e exsudato de semente de soja, contudo pode-se observar que houve maior expressão na presença de genisteína quando comparada ao seu calibrador do que quando induzido pelo exsudato, <sup>57</sup> poderia ser devido a interações entre substâncias presentes no mesmo ou até mesmo a concentração de genisteína, como já discutido para os demais genes avaliados neste experimento.

A expressão do gene *nopP* se faz necessária para a produção de proteínas efetoras como a NopP, cuja função é alterar o metabolismo de resposta de hipersensibilidade da planta, suprimindo a resposta de defesa do hospedeiro contra o simbionte e, conseqüentemente instalando a infecção (BÜTTNER; BONAS, 2006; SAAD *et al.*, 2005).

Saad *et al.* (2005) relataram que a ausência das proteínas efetoras (Nops), altera drasticamente a capacidade de nodulação em *Rhizobium* sp NGR234,

daí a necessidade de se estudar melhor a atuação do gene *nopP* em *B. japonicum* e utilizar os resultados na busca de estirpes mais eficientes.

## 6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- Após 15 min de indução por genisteína ocorreu aumento da expressão dos genes *nodC* e *nodW*, porém os maiores níveis de expressão foram detectados apenas após 48 h de crescimento das bactérias em presença do indutor;
- Apesar da variabilidade dos valores de RQ para o gene *nopP*, nos tempos de 15 min, 1 h, 4 h e 8h os níveis de expressão foram diminuindo enquanto que após 48 h em que as bactérias cresceram em presença de genisteína observou-se o maior nível de expressão;
- Os maiores níveis de expressão detectados dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP*, após 48 h em que a *B. japonicum* cresceu em presença de genisteína comparado do exsudato, indicam que a genisteína pura atua de modo mais efetivo na indução destes genes.

## REFERÊNCIAS

- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 385–414, 2004.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. **Comunicado Técnico**. Universidade Federal do Piauí, n. 11, p. 1-4, 2006.
- AUSMEES, N.; KOBAYASHI, H.; DEAKIN, W. J.; MARIE, C.; KRISHNAN, H. B.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. Characterization of NopP, a Type III secreted effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**. v. 186, p. 4774–4780, 2004.
- BIJLSMA, J. J. E.; GROISMAN, E. A. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 350-366, 2003.
- BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony – Minireview. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652, 2000.
- BROUGHTON, W. J.; ZHANG, F.; PERRET, X.; STAEHELIN, C. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 129–137, 2003.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 193–200, 2006.
- CONAB. 2009 disponível em: [http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/6graos\\_08.09.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/6graos_08.09.pdf). Acesso em: 18 mar. 2009.
- CORNELIS, G. R. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 355, p. 681-693, 2000.
- DROZDOWICZ, A. Bacterias do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (eds). **Biologia dos solos do cerrados**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 1997. p.17-67.
- DUONG, F.; WICKNER, W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 4871-4879, 1997.
- FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLIL, D.; SIMON, J.; NETO, D. D.; LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

- FARRELL, R. E. **RNA methodologies**: a laboratory guide for isolation and characterization. 2<sup>nd</sup>. [s.l.]: Academic Press, 1998.
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.
- GARCÍA, M. C. N.; PINO, J. C. C.; LUYTEN, E.; DOMBRECHT, B.; VANDERLEYDEN, J. Study of the inducer effect of molasses and soybean cake on synthesis and excretion of nodulation factors in different strains of *bradyrhizobium japonicum*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 43, p. 7-11, 2001.
- GODOY, L. P.; VASCONCELOS, A. T. R.; CHUEIRE, L. M. O.; SOUZA, R. C.; NICOLÁS, M. F.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2743-2753, 2008.
- GÖTTFERT, M.; GROB, P.; HENNECKE, H. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of the host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 87, p. 2680-2684, 1990.
- GRAHAM, T. L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. **Plant Physiology**, v. 95, p. 594-603, 1991.
- GROB, P.; HENNECKE, H.; GÖTTFERT, M. Cross-talk between the two-component regulatory systems NodVW and NwsAB of *Bradyrhizobium japonicum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 120, p. 349-354, 1994.
- HIRSCH, A.N.; BAUER, W.D.; BIRD, D.M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B.; YODER, J.I. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v.84, p.858-868, 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura de soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. (Embrapa Soja. Documentos, 283).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2006, p.43-93a.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, L. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 987-939, 2006b.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v. 97, p. 751–758, 1991.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SHUET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio na cultura de soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (eds) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMPRAPA – SPI, 1994. p.9-89.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S., Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Eds). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA, 1997. p.189-295.

KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEY, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine maxi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 7428-7432, 1987.

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GÖTTFERT, M. Mutational and transcriptional analysis of the Type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p. 1228–1235, 2002.

LANG, K.; LINDEMANN, A.; HAUSER, F. GÖTTFERT, M. The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 279, p. 203–211, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 16, p. 743–751, 2003.

LOH, J.; GARCIA, M.; STACEY, G. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3013-3020, 1997.

LOH, J.; LOHAR, D. P.; ANDERSEN, B.; STACEY, G. A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1759-1766, 2002.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **The American Phytopathological Society**, v. 16, p. 743–751, 2003.

MAZURIER, S.; LEMUNIER, M.; HARTMANN, A.; SIBLOT, S.; LEMANCEAU, P. Conservation of type III secretion system genes in *Bradyrhizobium* isolated from soybean. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 317-325, 2006.

MONTEROS, M. J.; BURTON, J. W.; BOERMA, H. R. Molecular mapping and confirmation of QTLs associated with oleic acid content in N))-3350 soybean. **Crop science**, v. 48, p. 2223-2234, 2008.

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**, 2003. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2006.

PERRET, X.; FREIBERG, C.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. J.; FELLAY, R. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 415-425, 1999.

PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v. 233, p. 977-980, 1986.

PHILLIPS, D. A.; STREIT, W. Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In: STACEY, G.; KEEN, N. T. **Plant: microbe interactions**. Chapman and Hall: New York, v.1, 1996, p.236-271.

PROMÉ, J. C.; DEMONT, N. Nodulations factors. In: STACEY, G.; KEEN, N. T. **Plant: microbe interactions**. Chapman and Hall: New York, v.1, 1996, p. 272 – 307.

REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Structural biology of bacterial pathogenesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 161-170, 2004.

ROCHE, P.; MAILLET, F.; PLAZANET, C.; DEBELLÉ, F.; FERRO, M.; TRUCHET, G. PROMÉ, J. C.; DÉNARIÉ, J. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 93, p. 15305-15310, 1996.

SAAD, M. M.; KOBAYASHI, H.; MARIE, C.; BROWN, I. R.; MANSFIELD, J. W.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. NopB, a Type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 1173–1181, 2005.

SKORPIL, P.; SAAD, M. M.; BOUKLI N. M.; KOBAYASHI, H.; ARES-ORPEL, N.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. 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**, v. 5, p. 1304-1317, 2005.

STACEY, G.; LIBAULT, M.; BRECHENMACHER, L.; WAN, J.; MAY, G. D., Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 110-121, 2006.

SÜB, C.; HEMPEL, J.; ZEHNER, S.; KRAUSE, A.; PATSCHKOWSKI, T.; GÖTTFERT, M. Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Biotechnology**, v.126, p. 69–77, 2006.

SUBRAMANIAN, S.; STACEY, G.; YU, O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 7, p. 282-285, 2007.

TREVASKIS, B.; COLEBATCH, G.; DESBROSSES, G.; WANDREY, M. WIENKOOP, S.; SAALBACH, G. UDVARDI, M. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. **Comparative and Functional Genomics**, v. 3, p. 151-157, 2002.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura de soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Eds **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina. EMBRAPA – CPAC. 1997. p.297-360.

VIPREY, V.; GRECO, D. A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1381–1389, 1998.

YIP, C. K.; STRYNADKA, N. C. J. New structural insights into the bacterial type III secretion system. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 31, p. 223-230, 2006.

WEI, M.; YOKOYAMA, T.; MINAMISAVA, K.; MITSUI, H.; ITAKURA, M.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SAEKI, K.; OMORI, H.; TAJIMA, S.; UCHIUMI, T.; ABE, M.; OHWADA, T. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **DNA Research**, v. 15, p. 201-214, 2008.

## **ANEXOS**

**Quadro 3** – Resultado da expressão do gene *nodW*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodW</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	21,18 21,14 21,34	21,22	0,11	20,14 19,96 19,99	20,03	0,101	1,189	0,103	-0,759	0,103	1,663
Metanol 15 min	21,70 21,65 21,68	21,68	0,03	19,81 19,70 19,69	19,73	0,069	1,947	0,052	0,000	0,052	1,000
Genisteína 1 hora	21,23 21,31 21,30	21,28	0,04	20,97 21,03 21,05	21,01	0,043	0,271	0,044	-0,085	0,044	1,058
Metanol 1 hora	21,57 21,59 21,63	21,60	0,03	21,20 21,31 21,22	21,24	0,059	0,356	0,047	0,000	0,047	1,000
Genisteína 4 horas	23,91 23,92 24,19	24,01	0,16	17,93 17,74 17,70	17,79	0,125	6,215	0,144	0,477	0,144	0,726
Metanol 4 horas	23,45 23,56 23,62	23,54	0,08	17,93 17,75 17,73	17,80	0,109	5,738	0,097	0,000	0,097	1,000
Genisteína 8 horas	22,74 22,82 22,89	24,82	0,08	18,02 18,00 17,92	17,98	0,056	6,838	0,067	4,052	0,067	0,066
Metanol 8 horas	20,71 20,32 20,15	20,39	0,29	17,71 17,55 17,56	17,61	0,090	2,786	0,214	0,000	0,214	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodW* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 4** – Resultado da expressão do gene *nodW*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodW</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	26,32 25,84 26,04	26,07	0,24	19,36 18,93 18,80	19,03	0,294	7,034	0,270	-0,801	0,270	1,711
Metanol 15 min	26,04 26,24 26,24	26,17	0,11	18,38 18,33 18,31	18,34	0,038	7,834	0,084	0,000	0,084	1,000
Genisteína 1 hora	26,04 26,00 26,13	26,06	0,07	18,73 18,80 18,73	18,75	0,040	7,305	0,055	1,090	0,055	0,482
Metanol 1 hora	26,10 25,00 24,82	25,31	0,69	19,01 19,15 19,11	19,09	0,070	6,216	0,494	0,000	0,494	1,000
Genisteína 4 horas	23,67 23,51 23,79	23,66	0,14	18,53 18,39 18,43	18,45	0,073	5,209	0,113	-2,099	0,113	4,085
Metanol 4 horas	26,73 26,72 26,78	26,74	0,04	19,48 19,43 19,39	19,44	0,046	7,308	0,041	0,000	0,041	1,000
Genisteína 8 horas	22,57 22,41 22,51	22,50	0,08	18,04 18,08 18,25	18,12	0,109	4,375	0,096	1,390	0,096	0,394
Metanol 8 horas	21,19 21,13 20,98	21,10	0,11	18,24 18,12 18,00	18,12	0,121	2,985	0,115	0,000	0,115	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodW* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 5** – Resultado da expressão do gene *nodW*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3).

Tratamento	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodW</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	26,23 25,77 26,05	26,02	0,23	19,02 18,89 18,78	18,90	0,121	7,117	0,186	-0,754	0,186	1,658
Metanol 15 min	26,07 26,24 26,26	26,19	0,10	18,35 18,31 18,30	18,32	0,029	7,871	0,074	0,000	0,074	1,000
Genisteína 1 hora	21,26 21,38 21,33	21,33	0,06	20,99 21,04 21,03	21,02	0,027	0,311	0,047	0,012	0,047	0,992
Metanol 1 hora	21,51 21,53 21,66	21,57	0,08	21,19 21,34 21,28	21,27	0,078	0,299	0,079	0,000	0,079	1,000
Genisteína 4 horas	24,50 24,50 24,70	24,57	0,12	20,74 20,71 20,46	20,64	0,153	3,934	0,136	2,076	0,136	0,249
Metanol 4 horas	23,97 23,92 23,98	23,96	0,03	22,25 22,11 21,94	22,10	0,151	1,858	0,109	0,000	0,109	1,000
Genisteína 8 horas	22,01 22,00 21,96	21,99	0,02	20,54 20,24 20,26	20,35	0,168	1,640	0,120	-13,330	0,120	7629,2
Metanol 8 horas	35,09 34,86 34,95	34,97	0,12	20,06 20,03 19,90	20,00	0,088	14,970	0,104	0,000	0,104	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta Ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta Ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodW* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 6** – Resultado da expressão do gene *nodC*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).

Tratamento	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodC</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	21,72 21,66 21,67	21,68	0,03	20,14 19,96 19,99	20,03	0,101	1,655	0,075	-0,535	0,075	1,432
Metanol 15 min	21,90 21,95 21,91	21,92	0,03	19,81 19,70 19,69	19,73	0,069	2,190	0,052	0,000	0,052	1,000
Genisteína 1 hora	21,57 21,50 21,55	21,54	0,03	20,97 21,03 21,05	21,01	0,043	0,528	0,039	-0,160	0,039	1,114
Metanol 1 hora	21,91 21,93 21,95	21,93	0,02	21,20 21,31 21,22	21,24	0,059	0,688	0,044	0,000	0,044	1,000
Genisteína 4 horas	23,36 23,52 23,41	23,43	0,08	17,93 17,74 17,70	17,79	0,125	5,639	0,106	0,226	0,106	0,859
Metanol 4 horas	23,15 23,27 23,23	23,22	0,06	17,93 17,75 17,73	17,80	0,109	5,412	0,088	0,000	0,088	1,000
Genisteína 8 horas	23,08 23,12 23,10	23,10	0,02	18,02 18,00 17,92	17,98	0,056	5,125	0,042	2,798	0,042	0,153
Metanol 8 horas	20,09 19,81 19,91	19,94	0,14	17,71 17,55 17,56	17,61	0,090	2,327	0,118	0,000	0,118	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodC* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 7** – Resultado da expressão do gene *nodC*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodC</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	22,34 22,48 22,49	22,44	0,09	19,36 18,93 18,80	19,03	0,294	3,405	0,217	-0,681	0,217	1,578
Metanol 15 min	22,42 22,40 22,45	22,42	0,03	18,38 18,33 18,31	18,34	0,038	4,086	0,034	0,000	0,034	1,000
Genisteína 1 hora	22,07 22,05 22,11	22,08	0,03	18,73 18,80 18,73	18,75	0,040	3,325	0,034	1,001	0,034	0,511
Metanol 1 hora	21,44 21,35 21,46	21,41	0,06	19,01 19,15 19,11	19,09	0,070	2,324	0,064	0,000	0,064	1,000
Genisteína 4 horas	23,74 23,36 23,29	23,46	0,24	18,53 18,39 18,43	18,45	0,073	5,016	0,180	-1,642	0,180	3,008
Metanol 4 horas	26,10 26,06 26,13	26,09	0,04	19,48 19,43 19,39	19,44	0,046	6,659	0,042	0,000	0,042	1,000
Genisteína 8 horas	21,82 21,84 21,91	21,86	0,05	18,04 18,08 18,25	18,12	0,109	3,733	0,084	1,582	0,084	0,346
Metanol 8 horas	20,25 20,31 20,25	20,27	0,03	18,24 18,12 18,00	18,12	0,121	2,151	0,088	0,000	0,088	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta Ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta Ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodC* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 8** – Resultado da expressão do gene *nodC*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nodC</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	22,35 22,48 22,50	22,44	0,09	19,23 18,87 18,86	18,99	0,211	3,455	0,161	-0,644	0,161	1,540
Metanol 15 min	22,43 22,42 22,47	22,44	0,03	18,39 18,35 18,29	18,34	0,053	4,099	0,043	0,000	0,043	1,000
Genisteína 1 hora	21,59 21,54 21,53	21,55	0,03	20,93 21,05 21,04	21,00	0,068	0,551	0,054	-0,097	0,054	1,067
Metanol 1 hora	21,89 21,91 21,92	21,91	0,01	21,23 21,29 21,26	21,26	0,032	0,648	0,025	0,000	0,025	1,000
Genisteína 4 horas	24,07 23,93 24,24	24,08	0,15	20,74 20,71 20,46	20,64	0,153	3,444	0,153	1,745	0,153	0,310
Metanol 4 horas	23,73 23,81 23,86	23,80	0,07	22,25 22,11 21,94	22,10	0,151	1,699	0,117	0,000	0,117	1,000
Genisteína 8 horas	22,22 24,00 22,30	22,84	1,01	20,54 20,24 20,26	20,35	0,168	2,489	0,722	-0,164	0,722	1,116
Metanol 8 horas	22,55 22,73 22,66	22,65	0,09	20,06 20,03 19,90	20,00	0,088	2,653	0,090	0,000	0,090	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodC* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 9** – Resultado da expressão do gene *nopP*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 1).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nopP</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	22,30 22,24 22,04	22,19	0,14	20,14 19,96 19,99	20,03	0,101	2,161	0,119	0,350	0,119	0,791
etanol 15 min	21,79 21,41 21,42	21,54	0,22	19,81 19,70 19,69	19,73	0,069	1,811	0,162	0,000	0,162	1,000
Genisteína 1 hora	22,77 22,57 22,52	22,62	0,13	20,97 21,03 21,05	21,01	0,043	1,608	0,097	0,103	0,097	0,934
Metanol 1 hora	22,82 22,72 22,71	22,75	0,06	21,20 21,31 21,22	21,24	0,059	1,505	0,058	0,000	0,058	1,000
Genisteína 4 horas	23,10 23,01 23,33	23,14	0,16	17,93 17,74 17,70	17,79	0,125	5,352	0,146	1,006	0,146	0,509
Metanol 4 horas	22,19 22,15 22,11	22,15	0,04	17,93 17,75 17,73	17,80	0,109	4,346	0,081	0,000	0,081	1,000
Genisteína 8 horas	22,11 22,05 22,04	22,07	0,04	18,02 18,00 17,92	17,98	0,056	4,088	0,047	2,050	0,047	0,253
Metanol 8 horas	20,17 19,31 19,46	19,65	0,46	17,71 17,55 17,56	17,61	0,090	2,038	0,331	0,000	0,331	1,000

<sup>1</sup> Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nopP* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 10** – Resultado da expressão do gene *nopP*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 2).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nopP</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	21,57 21,07 21,08	21,24	0,28	19,36 18,93 18,80	19,03	0,294	2,209	0,289	-0,809	0,289	1,720
Metanol 15 min	21,72 21,17 21,18	21,36	0,32	18,38 18,33 18,31	18,34	0,038	3,018	0,226	0,000	0,226	1,000
Genisteína 1 hora	21,27 21,22 21,23	21,24	0,03	18,73 18,80 18,73	18,75	0,040	2,487	0,033	1,263	0,033	0,429
Metanol 1 hora	20,44 20,26 20,25	20,31	0,11	19,01 19,15 19,11	19,09	0,070	1,224	0,091	0,000	0,091	1,000
Genisteína 4 horas	21,69 21,68 21,62	21,66	0,04	18,53 18,39 18,43	18,45	0,073	3,215	0,058	-1,613	0,058	2,951
Metanol 4 horas	24,32 24,24 24,23	24,26	0,05	19,48 19,43 19,39	19,44	0,046	4,828	0,047	0,000	0,047	1,000
Genisteína 8 horas	19,96 20,02 19,94	19,97	0,04	18,04 18,08 18,25	18,12	0,109	1,850	0,083	1,361	0,083	0,401
Metanol 8 horas	18,49 18,61 18,72	18,61	0,11	18,24 18,12 18,00	18,12	0,121	0,489	0,116	0,000	0,116	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nopP* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 11** – Resultado da expressão do gene *nopP*<sup>1</sup> sob indução com genisteína em diferentes tempos de indução (Repetição 3).

Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
	<i>nopP</i>			rRNA 16S							
	Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
Genisteína 15 min	21,49 21,09 21,10	21,23	0,23	19,15 18,96 18,98	19,03	0,153	2,196	0,193	-0,825	0,193	1,739
Metanol 15 min	21,75 21,19 21,20	21,38	0,32	18,39 18,37 18,32	18,36	0,038	3,021	0,230	0,000	0,230	1,000
Genisteína 1 hora	22,64 22,59 22,58	22,60	0,03	20,95 21,05 21,11	21,03	0,082	1,571	0,062	0,026	0,062	0,983
Metanol 1 hora	22,87 22,77 22,78	22,81	0,05	21,21 21,33 21,24	21,26	0,064	1,545	0,058	0,000	0,058	1,000
Genisteína 4 horas	24,24 24,02 24,10	24,12	0,11	20,74 20,71 20,46	20,64	0,153	3,483	0,134	1,560	0,134	0,351
Metanol 4 horas	24,06 23,99 24,01	24,02	0,03	22,25 22,11 21,94	22,10	0,118	1,922	0,087	0,000	0,087	1,000
Genisteína 8 horas	22,14 21,99 22,14	22,09	0,09	20,54 20,24 20,26	20,35	0,168	1,739	0,135	-0,592	0,135	1,487
Metanol 8 horas	22,29 22,50 22,20	22,33	0,16	20,06 20,03 19,90	20,00	0,088	2,330	0,127	0,000	0,127	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) em diferentes tempos de indução. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a repetição biológica e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta Ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta Ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nopP* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 12** – Resultado da expressão do gene *nodW*<sup>1</sup> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nodW</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Genisteína	32,56 32,53 32,40	32,50	0,09	22,24 22,05 22,11	22,14	0,10	10,36	0,09	-1,54	0,09	2,818
	Metanol	31,50 31,60 31,50	31,53	0,06	19,53 19,41 19,94	19,63	0,28	11,91	0,20	0,00	0,20	1,000
2	Genisteína	34,18 34,18 34,00	34,12	0,10	23,62 23,17 23,15	23,31	0,26	10,81	0,20	-2,79	0,20	6,494
	Metanol	33,67 33,90 33,54	33,70	0,18	20,19 20,09 20,04	20,11	0,08	13,60	0,14	0,00	0,14	1,000
3	Genisteína	33,11 33,16 32,93	33,07	0,12	27,64 27,33 27,46	27,48	0,16	5,59	0,14	-2,81	0,14	6,595
	Metanol	32,86 33,04 32,87	32,92	0,10	24,52 24,55 24,47	24,51	0,04	8,40	0,08	0,00	0,08	1,000

<sup>1</sup> Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com genisteína. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodW* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 13** – Resultado da expressão do gene *nodW*<sup>1</sup> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nodW</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Exsudato	32,62 32,38 32,33	32,44	0,16	21,61 21,57 21,50	21,56	0,056	10,882	0,118	-1,193	0,118	2,226
	Água	32,46 32,65 32,22	32,44	0,22	20,39 20,37 20,35	20,37	0,019	12,075	0,153	0	0,153	1,000
2	Exsudato	33,55 33,88 33,40	33,61	0,25	22,41 22,32 22,27	22,34	0,068	11,273	0,180	-1,365	0,180	2,497
	Água	34,12 33,46 33,47	33,68	0,38	21,11 20,98 21,04	21,05	0,063	12,637	0,270	0	0,27	1,000
3	Exsudato	33,09 33,12 32,96	33,05	0,08	23,11 23,06 23,06	23,08	0,029	9,973	0,063	-0,507	0,063	1,405
	Água	32,92 33,01 32,97	32,96	0,04	22,48 22,48 22,50	22,48	0,011	10,479	0,031	0	0,031	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodW* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com exsudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com exsudato subtraído do  $\Delta ct$  do controle com água. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodW* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 14** – Resultado da expressão do gene *nodC*<sup>1</sup> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nodC</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Genisteína	28,56 28,50 28,38	28,48	0,09	22,24 22,05 22,11	22,135	0,097	6,348	0,095	-2,395	0,095	4,984
	Metanol	28,34 28,41 28,36	28,37	0,03	19,53 19,41 19,94	19,626	0,278	8,743	0,198	0,000	0,198	1,000
2	Genisteína	30,12 29,79 29,80	29,90	0,19	23,62 23,17 23,15	23,314	0,263	6,589	0,228	-3,417	0,228	9,891
	Metanol	30,50 29,92 29,92	30,11	0,33	20,19 20,09 20,04	20,108	0,076	10,006	0,241	0,000	0,241	1,000
3	Genisteína	28,28 28,22 28,18	28,23	0,05	27,64 27,33 27,46	27,476	0,156	0,752	0,116	-2,905	0,116	7,017
	Metanol	28,21 28,13 28,17	28,17	0,04	24,52 24,55 24,47	24,515	0,038	3,657	0,040	0,000	0,040	1,000

<sup>1</sup> Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com genisteína. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições biológicas e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta Ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta Ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodC* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 15** – Resultado da expressão do gene *nodC*<sup>1</sup> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nodC</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Exsudato	28,43 28,45 28,46	28,44	0,01	21,61 21,57 21,50	21,558	0,056	6,889	0,041	-1,780	0,041	3,299
	Água	30,32 28,33 28,47	29,04	1,12	20,39 20,37 20,35	20,369	0,019	8,670	0,789	0	0,789	1,00
2	Exsudato	29,61 29,65 29,44	29,56	0,11	22,41 22,32 22,27	22,336	0,068	7,231	0,093	-1,163	0,093	2,181
	Água	29,57 29,36 29,38	29,43	0,11	21,11 20,98 21,04	21,046	0,063	8,393	0,091	0	0,090	1,00
3	Exsudato	28,12 28,14 28,12	28,13	0,01	23,11 23,06 23,06	23,080	0,029	5,049	0,022	-0,597	0,022	1,492
	Água	28,17 28,09 28,13	28,13	0,03	22,48 22,48 22,50	22,480	0,012	5,646	0,028	0	0,028	1,00

<sup>1</sup>Expressão do gene *nodC* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com exsudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta Ct$  o valor de  $\Delta Ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com exsudato subtraído do  $\Delta Ct$  do controle com água. O valor de  $\Delta Ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nodC* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 16** – Resultado da expressão do gene *nopP*<sup>1</sup> sob indução com genisteína (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nopP</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Genisteína	32,32 32,24 32,22	32,26	0,06	22,24 22,05 22,11	22,14	0,097	10,127	0,079	-3,142	0,079	8,223
	Metanol	32,25 33,50 32,94	32,89	0,63	19,53 19,41 19,94	19,63	0,278	13,268	0,485	0,000	0,485	1,000
2	Genisteína	34,38 34,48 34,09	34,32	0,20	23,62 23,17 23,15	23,31	0,263	11,003	0,234	-4,613	0,234	22,064
	Metanol	36,83 36,27 34,07	35,73	1,46	20,19 20,09 20,04	20,11	0,076	15,617	1,033	0,000	1,033	1,000
3	Genisteína	33,12 33,18 33,06	33,12	0,06	27,64 27,33 27,46	27,48	0,156	5,644	0,119	-3,001	0,119	7,484
	Metanol	33,34 33,11 33,03	33,16	0,16	24,52 24,55 24,47	24,51	0,038	8,645	0,118	0,000	0,118	1,000

<sup>1</sup>Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com genisteína. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com genisteína (1 $\mu$ M). Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com genisteína subtraído do  $\Delta ct$  do controle com metanol. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nopP* menos o ct do controle endógeno 16S.

**Quadro 17** – Resultado da expressão do gene *nopP*<sup>1</sup> sob indução com exsudato de semente de soja (Repetições 1, 2 e 3).

Repetição Biológica	Tratamentos	Ct (Cycle threshold)						$\Delta$ Ct	SD $\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	SD $\Delta\Delta$ Ct	RQ
		<i>nopP</i>			rRNA 16S							
		Valores	Média	SD	Valores	Média	SD					
1	Exsudato	33,65 33,36 33,44	33,483	0,15	21,61 21,57 21,50	21,56	0,056	11,925	0,115	-1,239	0,115	2,296
	Água	33,80 33,45 33,35	33,534	0,24	20,39 20,37 20,35	20,37	0,019	13,164	0,169	0,000	0,169	1,000
2	Exsudato	36,02 33,52 33,68	34,409	1,40	22,41 22,32 22,27	22,34	0,068	12,074	0,990	-2,053	0,990	3,961
	Água	37,98 33,76 33,77	35,172	2,43	21,11 20,98 21,04	21,05	0,063	14,126	1,720	0,000	1,720	1,000
3	Exsudato	33,21 32,76 32,93	32,966	0,22	23,11 23,06 23,06	23,08	0,029	9,886	0,160	-0,792	0,160	1,700
	Água	33,12 33,40 32,97	33,162	0,22	22,48 22,48 22,50	22,48	0,012	10,678	0,153	0,000	0,153	1,000

<sup>1</sup> Expressão do gene *nopP* de *B. japonicum* (CPAC 15) induzido com exsudato de semente de soja. Os mRNAs foram analisados por RT-qPCR de células crescidas em meio TY suplementado com exsudato de soja. Os dados são expressos pela Quantificação relativa (RQ) dos respectivos mRNAs normalizados pelo gene constitutivo 16S. Os dados expressos representam a média de três repetições e o desvio padrão. Os valores de RQ foram calculados com a equação  $2^{-\Delta\Delta ct}$ , sendo 2 o valor da eficiência da reação de PCR e  $\Delta\Delta ct$  o valor de  $\Delta ct$  (número de ciclos normalizados com o gene 16S) do tratamento com exsudato subtraído do  $\Delta ct$  do controle com água. O valor de  $\Delta ct$  para o tratamento e para o controle foi calculado a partir da subtração da média do ct do gene *nopP* menos o ct do controle endógeno 16S.