



**“1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase em
estirpes de *Mesorhizobium*: prevalência e efeito na
simbiose com *Cicer arietinum*”**

Francisco Xavier Inês Nascimento

Tese para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica pela
Universidade de Évora

Orientação: Professor Luís Alho

Co-orientação: Professora Solange Oliveira

Este trabalho inclui as correcções efectuadas pelo júri

**“1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)
desaminase em estirpes de *Mesorhizobium*: prevalência
e efeito na simbiose com *Cicer arietinum*”**

Francisco Xavier Inês Nascimento

Tese para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica pela Universidade de Évora

Orientação: Professor Luís Alho

Co-orientação: Professora Solange Oliveira

Este trabalho inclui as correcções efectuadas pelo júri

Évora, Abril de 2010

**“1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)
desaminase em estirpes de *Mesorhizobium*: prevalência
e efeito na simbiose com *Cicer arietinum*”**

Francisco Xavier Inês Nascimento

Orientação: Professor Luís Alho

Departamento de Biologia

Universidade de Évora

Co-orientação: Professora Solange Oliveira

Departamento de Biologia

Universidade de Évora

Todo este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da
Universidade de Évora

Dedico esta tese à minha querida Avó Laurinda

por todo o seu amor e dedicação...

Agradecimentos

A realização deste trabalho apenas foi possível com o apoio e ajuda de muitas pessoas às quais gostaria de agradecer:

Aos meus pais, irmã e avós por todo o seu amor e apoio, pois sem eles não seria possível toda uma vida académica que culmina com a elaboração desta tese de mestrado.

À Professora Solange Oliveira, minha orientadora, por me ter “acolhido” na sua equipa e por ter possibilitado todo o desenvolvimento desta tese, nunca limitando e sempre apoiando a realização de todo este trabalho, permitindo toda a minha aprendizagem.

Ao Professor Luís Alho, meu orientador, por todo o conhecimento de “engenharia” a mim transmitido, fundamental para o meu desenvolvimento, abrindo novos horizontes no campo de investigação. E também por todos os momentos de alegria proporcionados dentro e fora da Universidade, por vezes até nos bares.

Especialmente à minha colega Clarisse Brígido, minha “tutora”, por todo o seu apoio, suporte, ajuda, amizade, divertimento e por tudo o que me ensinou dentro e fora do laboratório, possibilitando toda esta tese. E também por todos os bons momentos passados, que de certo modo, me ajudaram no meu desenvolvimento como cientista e pessoa.

À minha colega Ana Alexandre por toda a sua ajuda, apoio e por muitos bons momentos no laboratório (o seu fantástico cheesecake que me deu muita energia para a realização deste trabalho).

À minha colega Marta Laranjo pela sua boa disposição e simpatia, fazendo-me sentir integrado na equipa do laboratório e também por toda a ajuda fornecida no decorrer deste trabalho.

À minha colega Cláudia Vicente pela sua amizade, carinho, apoio e principalmente por toda a confiança depositada em mim.

À D. Gertrudes Mariano pela importante ajuda técnica fornecida ao longo deste trabalho.

Ao Professor Bernard Glick (Universidade de Waterloo, Canadá) pela cedência de algumas estirpes, do plasmídeo pRKACC e pela sua importante influência na escolha deste tema de tese.

A todo o pessoal do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Évora, pela cedência de algum material, aparelhos e também pelos bons momentos passados durante a hora de almoço.

A todo o pessoal do Laboratório de Nematologia da Universidade de Évora por todos os momentos de boa disposição passados dentro e fora da Universidade.

À minha “crew”, In Motion, por me levarem para longe dos “livros” e em especial ao meu amigo André Garcia pela ajuda na criação de algumas imagens.

Resumo

A simbiose entre leguminosas e rizóbio é um dos principais contributos para a fixação biológica do azoto, constituindo uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos. As cultivares de *Cicer arietinum* (L.) de sementeira antecipada Outono-Inverno são bastante susceptíveis ao encharcamento o que leva a uma redução da sua produtividade. Em condições de encharcamento ocorre um aumento da concentração de etileno na planta que poderá levar à sua morte.

Organismos que produzem a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (E.C. 3.5.99.7) responsável pela degradação de ACC (precursor do etileno) em amónia e α -cetobutirato, são capazes de promover o crescimento de plantas através da redução dos níveis de etileno na planta.

O principal objectivo deste estudo é a obtenção de estirpes de *Mesorhizobium* de grão-de-bico, transformadas com um gene *acdS* codificando a enzima ACC desaminase, promovendo assim o crescimento de grão-de-bico em condições normais e de encharcamento. Foi também estudada a prevalência de genes *acdS* em isolados nativos de *Mesorhizobium* de grão-de-bico.

Neste estudo foram transformadas sete estirpes de *Mesorhizobium* por conjugação triparental. Através da expressão de um gene *acdS* exógeno, o isolado T-1-Telhado aumentou a sua capacidade de nodular grão-de-bico em 100% (em condições normais). A duplicação do número de nódulos resultou num aumento de cerca de 74% na biomassa total da planta de grão-de-bico. Não foi encontrada qualquer relação entre a actividade da enzima ACC desaminase e o complexo enzimático nitrogenase (E.C. 1.18.6.1) responsável pela fixação de azoto atmosférico.

Em condições de encharcamento não se verificou qualquer aumento do crescimento da planta de grão-de-bico inoculada com a estirpe transformada. Ambas as estirpes, transformada e “wild type”, tiveram o mesmo comportamento. Em condições de encharcamento foram formados mais nódulos pela estirpe “wild type” quando em comparação com o mesmo tratamento em condições normais. Estes resultados sugerem que em condições de stresse outros mecanismos de regulação da formação de nódulos poderão ser activados e que estes não estão associados aos efeitos do etileno.

O gene *acdS* foi detectado pelo método de PCR em 11 dos 56 isolados estudados. A análise filogenética demonstrou que estes genes são similares ao gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099, o que sugere que estes possam ter sido adquiridos por transferência horizontal. A análise pelo método de hibridação de Southern revelou a presença de apenas uma cópia do gene *acdS*. Através do método de hibridação de Southern foram também detectados outros genes *acdS* que não foram detectados pelo método de PCR. Os resultados obtidos permitiram verificar pela primeira vez a presença de genes *acdS* em isolados das espécies *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. huakui*, *M. mediterraneum* e *M. ciceri*.

“1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase in *Mesorhizobium*: prevalence and effect in the symbiosis with *Cicer arietinum*”

Abstract

The symbiotic association between rhizobia and leguminous plants is one of the major contributors to the total biological nitrogen fixation, which is an alternative to the use of nitrogen fertilizers that lead to unacceptable pollution levels. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) winter cultivars are very susceptible to waterlogging conditions, leading to the reduction of this crop productivity. Waterlogging conditions increase plant ethylene concentration which can cause plant death

Organisms that produce the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (E.C. 3.5.99.7), responsible for the conversion of ACC (the precursor of ethylene in plants) into ammonia and α -ketobutyrate, can promote plant growth by decreasing ethylene levels.

The main goal of this study is to obtain chickpea mesorhizobia transformed with an ACC deaminase gene (*acdS*), capable of decreasing ethylene levels and subsequently increasing plant growth under normal and waterlogging conditions. The detection of *acdS* genes in a portuguese chickpea mesorhizobia collection was also studied.

In this work, seven *Mesorhizobium* chickpea strains were transformed with a *acdS* gene by triparental conjugation. By expressing an exogenous *acdS* gene, the transformed strain T-1-Telhado increased its ability to nodulate chickpea by 100% when compared to the “wild type” strain, under normal conditions. This ability to duplicate nodule number resulted in a 74% increase in chickpea total biomass. No significant relation was found between ACC deaminase and nitrogenase (E.C. 1.18.6.1) activity.

Under waterlogging conditions there wasn't any increase in plant growth promotion by the transformed *Mesorhizobium* strain. Both T-1-Telhado and T-1-Telhado pRKACC strains had the same behavior. Under stress conditions, more nodules were formed by the “wild type” strain when compared to normal conditions. These

results suggest that under stress conditions other mechanisms of nodule formation and regulation could be activated and they might not be associated with ethylene levels.

The *acdS* gene was detected in 11 of 56 tested isolates, by PCR method. Phylogenetic analysis showed that these *acdS* genes were similar to *M. loti* MAFF303099 *acdS* gene, suggesting that these could be obtained by horizontal transfer. Southern hybridization analysis revealed that only one copy of the *acdS* gene is present in chickpea mesorhizobia strains. On the other hand, Southern hybridization analysis showed *acdS* genes undetected by the PCR method. This is the first report of the presence of an *acdS* gene in species of *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. huakui*, *M. mediterraneum* and *M. ciceri*

Lista de abreviaturas

- ACC**- 1-aminociclopropano-1-carboxilato
ACCD- 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase
Adomet- S-adenosil-L-metionina
MTA- 5'-metiltioadenosina
PLP- Fosfato piridoxal
IAA- ácido indoleacético
AMP- adenosina monofosfato
ADP- adenosina difosfato
ATP- adenosina trifosfato
DNA- ácido desoxirribonucleico
CRP- proteína receptora de AMP cíclico
FNR- proteína reguladora da redução fumarato-nitrato
LRP- proteína reguladora "leucine responsive"
dNTP- trifosfato desoxirrinucleótido
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
Tris- tris (hidroximetil) aminometano
TBE- Tris-borato EDTA
TAE- Tris-acetato EDTA
SDS- dodecil sulfato de sódio
SSC- tampão salino de citrato de sódio
BSA- albumina de soro bovino
ORF- "open reading frame"
PCR- "polymerase chain reaction"
PGPR- "plant growth promoting rhizobacteria" (rizobactérias que promovem o crescimento de plantas).
PGPB- "plant growth promoting bacteria" (bactérias que promovem o crescimento de plantas).
OD- densidade óptica
DAI- dias após inoculação
E.S- eficiência simbiótica
U- unidade
w/v- relação peso/volume
v/v-relação volume/volume
pb- pares de bases
Kb- Kilobases
Mb- Megabases
n.d- não determinado
sp./spp.- espécie
r.p.m- rotações por minuto
- Bases nucleotídicas:** **C**- citosina; **G**- guanina; **T**- timina; **A**- adenina.

Lista de figuras

	Página
Fig.1 – Infecção de plantas leguminosas por rizóbio (adaptado de Oldroyd e Downie, 2004).	5
Fig.2- Ciclo de Yang e via biossintética do etileno (adaptado de McKeon <i>et al.</i> , 1995).	9
Fig.3- Produção de etileno pela planta em função do tempo, após stresse ambiental (adaptado de Glick <i>et al.</i> , 2007).	10
Fig.4 Degradação de ACC pela enzima ACC desaminase (ACCD), formando α -cetobutirato e amónia como produtos de reacção (adaptado de Hontzeas <i>et al.</i> , 2004).	12
Fig 5.- Modelo de regulação transcricional de ACC desaminase de <i>Pseudomonas putida</i> UW4 (adaptado de Glick <i>et al.</i> , 2007).	16
Fig.6- Esquema representativo da região a jusante e a montante do gene <i>acdS</i> (mlr5932) de <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 (adaptado de Uchiumi <i>et al.</i> , 2004).	17
Fig.7 - Esquema representativo do mecanismo pelo qual a PGPR se liga à raiz ou semente de uma planta, diminui a concentração de etileno e assim previne a inibição do alongamento da raiz. (adaptado de Glick <i>et al.</i> , 1998).	19
Fig.8- Representação esquemática do plasmídeo pRKACC (adaptado de Shah, <i>et al.</i> 1998).	33
Fig.9- Esquema representativo do método de obtenção de acetileno pela prática corrente no Laboratório de Microbiologia do solo da Universidade de Évora.	38
Fig.10- Detecção do gene <i>acdS</i> , pelo método de PCR, em 11 dos isolados estudados neste trabalho.	40
Fig.11- Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (600 pb) do gene <i>acdS</i> mostrando as relações entre isolados onde foi detectado o gene <i>acdS</i> e várias estirpes bacterianas.	42
Fig.12- Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (617 pb) do 16S rDNA mostrando as relações entre isolados onde foi detectado o gene <i>acdS</i> e várias estirpes de rizóbio.	43
Fig.13- Número de cópias do gene <i>acdS</i> detectadas pelo método de hibridação de Southern, nos 11 isolados possuidores do gene <i>acdS</i> .	45
Fig. 14- Detecção do gene <i>acdS</i> pelo método de hibridação de Southern em 6 das estirpes escolhidas para o processo de transformação.	46
Fig.15- Detecção do gene <i>acdS</i> em estirpes “tipo” de <i>Mesorhizobium</i> através do método de hibridação de Southern.	47
Fig.16- Análise da transformação de estirpes de <i>Mesorhizobium</i> por conjugação triparental. Análise do crescimento em placa e em meio líquido.	50
Fig.17- Gel de agarose contendo os produtos da extracção de plasmídeo pRKACC.	51
Fig.18- Árvore filogenética com base na sequência nucleotídica parcial (617 pb) do 16S rDNA mostrando as relações entre isolados escolhidos para transformação e estirpes tipo de <i>Mesorhizobium</i> .	54

Fig.19- Análise qualitativa da reversão, após transformação através do crescimento em meio sólido de bactérias obtidas a partir de nódulos.	58
Fig.20- Esquema representativo da utilização dos produtos de degradação do ACC e sua vantagem na multiplicação e viabilidade celular da estirpe de <i>Mesorhizobium</i> transformada.	61
Fig.21- Esquema representativo da acção do etileno no processo de percepção dos factores Nod (adaptado de Oldroyd <i>et al.</i> , 2001) e o possível papel da acção da enzima ACC desaminase (produzida em condições de vida livre) na modulação deste processo.	62
Fig.22- Esquema representativo do mecanismo pelo qual a estirpe de <i>Mesorhizobium</i> transformada poderá diminuir os níveis de etileno na planta de grão-de-bico.	63
Fig.23- Esquema representativo do mecanismo de acção do gene <i>acdS</i> de <i>M.loti</i> MAFF303099. Este mecanismo poderá ser utilizado pela estirpe T-1-Telhado “wild type”.	67
Fig.24- Representação esquemática de um processo possivelmente responsável pela ausência de diferenças significativas no número de nódulos entre tratamentos.	73
Fig.25- Representação esquemática de um processo dependente do nitrato possivelmente responsável pela ausência de diferenças significativas no número de nódulos entre tratamentos.	75
Fig.26- Possível mecanismo de regulação da nodulação em condições de encharcamento.	76

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Caracterização dos isolados e estirpe “tipo” de <i>Mesorhizobium</i> de grão-de-bico seleccionados para o processo de transformação.	31
Tabela 2- Estirpes utilizadas no processo de transformação por conjugação triparental.	32
Tabela 3- Valores da actividade enzimática da ACC desaminase nas estirpes de <i>Mesorhizobium</i> “wild type” e transformadas.	52
Tabela 4- Valores da actividade enzimática da ACC desaminase de várias estirpes bacterianas.	55
Tabela 5- Análise “ <i>in vitro</i> ” da taxa de reversão da estirpe T-1-Telhado pRKACC.	56
Tabela 6 - Actividade específica do complexo enzimático nitrogenase nos diversos tratamentos ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-), em condições normais.	68
Tabela 7- Actividade específica do complexo enzimático nitrogenase nos diversos tratamentos ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-) e em condições de stresse.	79
Tabela 8- Peso por nódulo e biomassa total de planta de grão-de-bico em condições normais e stresse, 45 dias após inoculação.	81

Lista de gráficos

	Página
Gráfico 1- Comparação da actividade enzimática da ACC desaminase entre as estirpes de <i>Mesorhizobium</i> transformadas, <i>P.putida</i> UW4 (Ma <i>et al.</i> , 2003 ^b), <i>P.putida</i> ATCC 17399 pRKACC e <i>P.fluorescens</i> ATCC 17400 pRK ACC (Shah, <i>et al.</i> , 1998).	53
Gráfico 2- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação.	59
Gráfico 3- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, em 3 tempos de colheita distintos (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-).	60
Gráfico 4- Peso seco dos nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação.	64
Gráfico 5- Peso médio de cada nódulo formado pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação.	65
Gráfico 6- Peso médio de cada nódulo formado pelas estirpes “wild type” e transformada em 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-), sob condições normais.	66
Gráfico 7- Actividade do complexo enzimático nitrogenase por peso de nódulo em plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, 45 dias após inoculação.	68
Gráfico 8- Biomassa total de plantas inoculadas com estirpe “wild type” ou transformada, 45 dias após inoculação.	69
Gráfico 9- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação (17 dias após remoção do stresse).	70
Gráfico 10- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais e stresse, 45 dias após inoculação.	71
Gráfico 11- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-), em condições de stresse.	72
Gráfico 12- Peso seco dos nódulos formados nos diferentes tratamentos na condição de stresse, 45 dias após inoculação.	77
Gráfico 13- Peso por nódulo nos diferentes tratamentos na condição de stresse, 45 dias após inoculação.	77
Gráfico 14 - Peso por nódulo de cada tratamento ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-), em condições de stresse.	78
Gráfico 15- Actividade do complexo enzimático nitrogenase por peso de nódulo em plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação.	79
Gráfico 16- Biomassa total de plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação.	80

Índice

Introdução geral	1
1. “ <i>Plant growth promoting bacteria</i> ” e crescimento de plantas	2
2. Rizóbio e fixação biológica de azoto	3
3. Nodulação de plantas leguminosas por rizóbio	4
4. <i>Cicer arietinum</i>	5
5. Efeito do encharcamento no desenvolvimento de plantas	7
6. Biosíntese e efeito do etileno no desenvolvimento de plantas	8
6.1 Efeito do etileno na nodulação de leguminosas	10
7. A enzima ACC desaminase (E.C. 3.5.99.7)	11
7.1 Distribuição e origem da ACC desaminase	12
7.2 Prevalência da enzima ACC desaminase em rizóbio	14
7.3 Regulação transcricional do gene <i>acdS</i>	15
7.4 Níveis de expressão da enzima ACC desaminase	17
7.5 Diminuição dos níveis de etileno pela ACC desaminase	18
8. Transformação de bactérias com o gene <i>acdS</i>	19
Material e Métodos	
1. Detecção de genes <i>acdS</i> em estirpes de <i>Mesorhizobium</i>	22
1.1 Extracção rápida de DNA	22
1.2 Isolamento do DNA total	22
1.3 Detecção do gene <i>acdS</i> em isolados de <i>Mesorhizobium</i> através do método de PCR	22
1.4 Amplificação do 16S rDNA	23
1.5 Análise Filogenética	24
1.6 Hibridação pelo método de Southern	24
1.6.1 Marcação da sonda	24
1.6.2 Digestão com enzima de Restrição <i>BamHI</i>	25
1.6.3 Transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose	25
1.6.4 Hibridação	26
1.6.5 Detecção	26
2. Determinação da actividade enzimática da ACC desaminase	27
2.1 Preparação dos padrões	27
2.2 Indução da actividade da ACC desaminase	27
2.3 Preparação das amostras a quantificar	28

2.4	Medição da quantidade de α -cetobutirato produzido	28
2.5	Quantificação das proteínas totais	29
3.	Transformação de estirpes de <i>Mesorhizobium</i> por conjugação triparental	30
3.1	Escolha das estirpes a transformar	30
3.2	Método de conjugação triparental	32
3.3	Análise qualitativa do processo de transformação	34
3.3.1	Extracção do plasmídeo pRKACC.....	34
3.4	Análise da taxa de reversão de transformação	34
3.4.1	Análise da taxa de reversão de transformação- <i>In vitro</i>	35
3.4.2	Análise da taxa de reversão de transformação após simbiose.....	35
4.	Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre <i>Mesorhizobium</i> e <i>Cicer arietinum</i>	36
4.1	Medição da actividade do complexo enzimático nitrogenase por cromatografia gasosa	37
4.1.1	Obtenção de acetileno	38
4.1.2	Tratamento da raíz.....	38
4.1.3	Quantificação por cromatografia gasosa	39
4.2	Análise estatística dos resultados	39

Resultados e discussão

1.	Detecção do gene <i>acdS</i> em isolados de <i>Mesorhizobium</i> de grão-de-bico através do método de PCR	40
2.	Análise Filogenética do gene <i>acdS</i>	41
3.	Medição da actividade da ACC desaminase nos isolados possuídores do gene <i>acdS</i>	44
4.	Análise do número de cópias do gene <i>acdS</i>	44
5.	Análise qualitativa do processo de transformação por conjugação triparental	49
5.1	Análise do crescimento em placa e em meio líquido	49
5.2	Extracção do plasmídeo	50
5.3	Medição da actividade enzimática da ACC desaminase	52
5.4.	Análise da taxa de reversão.....	56
6.	Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre <i>Mesorhizobium</i> e <i>Cicer arietinum</i> (Condições normais).....	58
6.1	Número de nódulos	58
6.2	Peso seco de nódulos.....	64
6.3	Actividade do complexo enzimático nitrogenase.....	67
6.4	Biomassa total	69
7.	Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre <i>Mesorhizobium</i> e <i>Cicer arietinum</i> (Condições de encharcamento).....	70

7.1	Número de nódulos	70
7.2	Peso seco nódulos.....	76
7.3	Actividade do complexo enzimático nitrogenase.....	78
7.4	Biomassa total	80
7.5	Efeito do encharcamento no desenvolvimento da planta	80
Conclusões		82
Perspectivas futuras		85
Bibliografia		86
Anexos		
1.	Anexo 1	99
2.	Anexo 2	101
3.	Anexo 3	102
4.	Anexo 4	103

Introdução geral

A crescente preocupação da sociedade sobre problemas ambientais causados directa ou indirectamente pelo uso de fertilizantes, pesticidas e herbicidas levou à consideração de medidas alternativas a esta estratégia de utilização de agro-químicos para promover ou facilitar o crescimento de plantas na agricultura, horticultura e silvicultura. A utilização de “plant growth promoting rhizobacteria” (PGPR) (Zahir *et al.*, 2004; Nelson, 2004), tais como rizóbio, pode constituir uma alternativa. A relação simbiótica entre rizóbios e plantas leguminosas é uma das principais fontes de fixação biológica de azoto. No processo simbiótico de fixação de azoto, os rizóbios convertem o azoto atmosférico (N_2), não assimilável, em amónia (NH_4^+) passível de ser utilizado pela planta leguminosa hospedeira.

Em condições de stresse, como por exemplo encharcamento, o estado fisiológico da planta é alterado, podendo constituir um factor perturbador na relação simbiótica. A fitohormona etileno é a principal responsável por diversos processos de desenvolvimento na planta (Abeles *et al.*, 1992) sendo conhecido que o aumento da sua concentração pode levar à inibição do crescimento e mesmo à morte da planta (Hyodo, 1991). O etileno é também responsável por mecanismos de inibição da infecção e nodulação de plantas leguminosas por rizóbio (Hirsch e Fang, 1994).

Estudos recentes demonstram que algumas espécies de rizóbio (Ex. *Rhizobium leguminosarum*) podem reduzir os níveis de etileno na planta através da produção da enzima ACC desaminase que hidrolisa ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), o precursor de etileno em plantas, em amónia e α -cetobutirato (Honma e Shimomura, 1978), levando ao aumento da taxa de nodulação e conseqüente promoção do crescimento de plantas (Ma *et al.*, 2003^a).

A transformação de estirpes de rizóbio com genes *acdS* e as suas regiões reguladoras demonstrou ser uma importante e valiosa ferramenta na medida em que veio possibilitar o aumento da eficiência, competitividade e conseqüente utilização dessas estirpes (Ma *et al.*, 2003^a).

1. “*Plant growth promoting bacteria*” e crescimento de plantas

O crescimento de plantas pode ser inibido por um amplo número de factores causadores de stresse. Entre esses factores estão a seca, encharcamento, temperaturas extremas, radiação, presença de metais tóxicos e matéria orgânica contaminante, alta concentração salina, predação por insectos e vários agentes patogénicos como vírus, bactérias ou fungos (Abeles *et al.*, 1992).

O crescimento da planta consiste em períodos de crescimento máximo intercalados com períodos de inibição de crescimento. Na presença de stresse ocorre uma inibição do crescimento da planta que poderá cessar após remoção do stresse ou através da capacidade da planta em ajustar o seu metabolismo. Como consequência da acumulação e da intensidade do stresse ambiental durante o ciclo de vida da planta, o seu crescimento será bastante menor do que seria na ausência de stresse (Glick *et al.*, 1997).

Algumas bactérias do solo podem ajudar a planta a superar uma grande variedade de stresses ambientais. Essas bactérias são denominadas de “plant growth promoting bacteria” (bactérias que promovem o crescimento de plantas) ou PGPB.

As PGPB’s podem associar-se às plantas de diversas formas e em diferentes localizações, sendo na raiz o local onde estas se encontram em maiores concentrações. Isto ocorre, provavelmente, devido à presença de nutrientes exsudados pela raiz da planta, podendo estes constituir cerca de 40% dos produtos de fotossíntese (Nelson, 2004), que de certo modo fornecem energia e suportam o crescimento destas bactérias. Visto que a maior parte destas bactérias se encontram na raiz ou sementes da planta, são denominadas então como PGPR’s (plant growth promoting rhizobacteria) (Zahir *et al.*, 2004; Nelson, 2004). Existem dois tipos de PGPR’s, aquelas que formam relações simbióticas com a planta, o que envolve a formação de estruturas especializadas, tais como nódulos na raiz de leguminosas (Glick, 2005), ou bactérias de estado livre que interagem com as raízes (Glick, 1995; Zahir *et al.*, 2004; Glick, 2005).

As PGPR’s podem aumentar o crescimento de plantas directa ou indirectamente, através de variados mecanismos. Podem actuar directamente através da fixação de azoto que é transferido para a planta (como é o caso de rizóbio); produção de sideróforos que capturam iões ferro e os deixam disponíveis para a raiz da planta; solubilização de

minerais como fósforo; produção de fitohormonas como auxina e ácido indoleacético (IAA); síntese de outros compostos ou enzimas que podem intervir no desenvolvimento e crescimento de plantas (Glick, 1995; Brown, 1974, Kloepper *et al.*, 1989; Glick 2005). Indirectamente por parte da sua acção como agentes de biocontrolo de organismos fitopatogénicos (através da produção de antibióticos, enzimas líticas, entre outros) (Glick *et al.*, 2007). Além destes mecanismos, as PGPR's podem promover o crescimento de plantas através da acção da enzima ACC desaminase que degrada ACC, o precursor de etileno, e assim diminui os níveis de etileno que em elevadas concentrações poderá ser nocivo para a planta (Glick, 1995; Jacobson *et al.*, 1994; Glick *et al.*, 1998).

2. Rizóbio e fixação biológica de azoto

Os rizóbios são bactérias Gram-negativas, aeróbias, não esporuladas e em forma de bastonete (Elkan e Bunn, 1994; Jordan, 1984; Sadowsky e Graham, 2000), que têm a capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com plantas leguminosas através da formação de nódulos nas raízes, onde se efectua a fixação de azoto atmosférico.

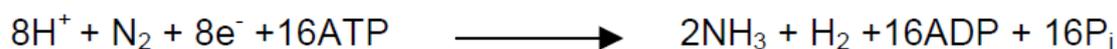
A sua temperatura óptima de crescimento situa-se geralmente entre os 25 e 30°C e o valor óptimo de pH entre 6 e 7 (Somasegaren e Hoben, 1994). Em meio sólido de manitol e extracto de levedura formam colónias circulares, convexas, semi-translúcidas e mucilaginosas que após 3 a 5 dias de crescimento podem atingir 2 a 4 mm de diâmetro (Somasegaren e Hoben, 1994). São bactérias móveis por meio de 2 a 6 flagelos ou apenas 1 flagelo polar ou subpolar e são geralmente pleiomórficos sob condições adversas (Pelzcar *et al.*, 1993).

O genoma dos rizóbios é constituído por um cromossoma e frequentemente por um ou mais plasmídeos de tamanho variável que quando atingem grandes dimensões (1-2 Mb) são designados de megaplasmídeos.

Os rizóbios pertencem ao sub-grupo das α -Proteobacteria, podendo ser divididos em 5 géneros: *Rhizobium* (Jordan, 1982), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Dentro deste 5 géneros estão distribuídas várias espécies de rizóbio conhecidas.

A relação simbiótica de rizóbios com plantas leguminosas é um dos principais contribuintes para a fixação biológica de azoto (Newton, 2000; Gage, 2004). Esta associação mutualista entre planta e bactéria representa custos bastante reduzidos e é geralmente mais eficiente do que a utilização de fertilizantes químicos, podendo consistir numa alternativa biológica não agressiva para o ambiente, já que o uso de fertilizantes químicos azotados leva a níveis de poluição inaceitáveis (Zahran, 1999). Além disso, a sua utilização pode também reduzir o gasto de combustíveis fósseis e ajudar na recuperação da fertilidade de solos (Burriss, 1994; Sprent e Sprent, 1990).

O processo de fixação de azoto ocorre nos nódulos formados na planta e consiste na redução de azoto atmosférico (N₂) a amónia (NH₄⁺) pelo complexo enzimático nitrogenase (E.C. 1.18.6.1), de acordo com a seguinte reacção:



A elevada energia necessária para quebrar a ligação do azoto molecular, faz com que a redução de azoto seja um processo dispendioso do ponto de vista energético onde o rizóbio chega a consumir 20% do ATP produzido pela planta (Voet e Voet, 1995). A capacidade de fixação de azoto pela simbiose pode atingir 150 a 200 kg de azoto por hectare por ano, dependendo das condições da cultura (Black, 1996).

3. Nodulação de plantas leguminosas por rizóbio

O desenvolvimento de nódulos na raiz é consequência de uma complexa série de interacções entre rizóbio e a planta leguminosa hospedeira (Fisher e Long, 1985) (**Figura 1**). O processo de formação de nódulos inicia-se com a troca de sinais específicos a nível molecular entre a planta e o rizóbio que se encontra no seu estado livre. A planta segrega pela raiz vários compostos orgânicos, entre os quais flavonóides, que assumem particular relevo pois possuem a capacidade de induzir a activação de genes (*nod*) de nodulação bacterianos (Redmond *et al.*, 1986). Os compostos orgânicos segregados pela raiz também vão levar a uma acumulação de bactérias junto da raiz (conhecido como efeito rizosférico). A activação dos genes *nod* induz a expressão de moléculas sinalizadores conhecidas como factores *Nod* (Perre *et al.*, 2000). Estes vão estimular os pêlos radiculares que se vão enrolar formando uma invaginação da parede

celular (Yao e Vincent, 1969) permitindo a entrada de rizóbios na planta. Os rizóbios vão então invadir a raiz através da extremidade do pêlo radicular onde vão posteriormente induzir a formação de um canal de infecção, conhecido como cordão de infecção (estrutura tubular que penetra as células corticais da raiz desde a extremidade do pêlo radicular) (Callaham e Torrey, 1981), pelo qual vai atravessar até atingir as células corticais da raiz onde vai sofrer diferenciação para a sua forma simbiótica de bacteróide fixador de azoto dando origem a um novo órgão na planta, o nódulo (Xi *et al.*, 2000).

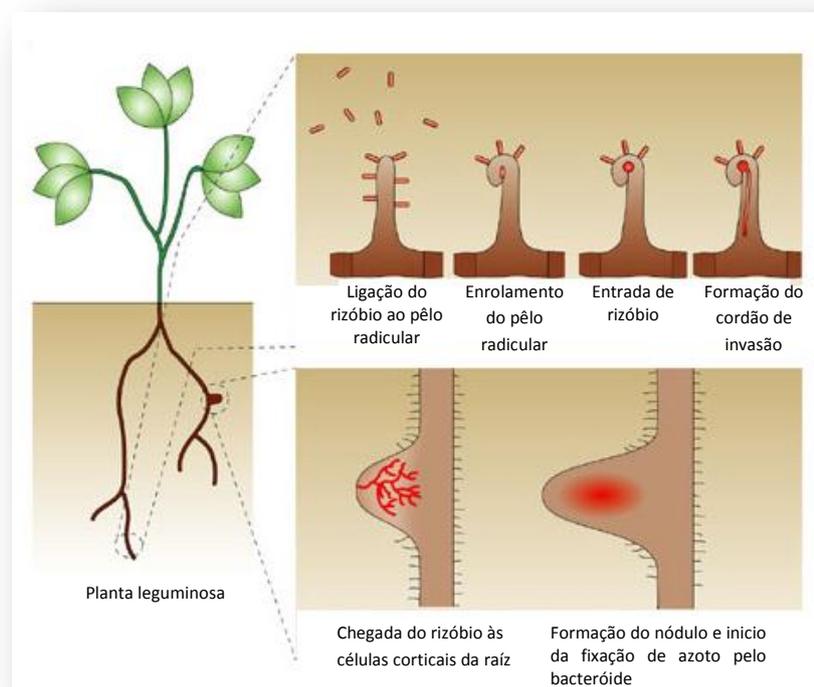


Fig.1 – Infecção de plantas leguminosas por rizóbio (adaptado de Oldroyd e Downie, 2004).

Apesar da formação de nódulos estar directamente relacionada com a resposta da planta hospedeira aos factores *Nod* libertados pela bactéria, sabe-se que a percepção de sinais internos, particularmente de fitohormonas, é também bastante importante para o estabelecimento da relação simbiótica entre rizóbio e planta leguminosa (Caetano Anolles e Gresshoff, 1991).

4. *Cicer arietinum*

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é uma das principais culturas de leguminosas, ocupando em todo o mundo uma área de cultivo superior a 11 milhões de hectares. O seu grão é uma importante fonte de energia e proteína na dieta humana e

animal. A planta de grão-de-bico apresenta também um importante papel na manutenção da fertilidade do solo, através da sua relação simbiótica fixadora de azoto (Yadav *et al.*, 2007). Em condições favoráveis a planta de grão-de-bico permite uma fixação biológica de azoto na ordem dos 80 a 120 kg N ha⁻¹ (Saxena, 1987).

Na bacia Mediterrânica o grão-de-bico era tradicionalmente utilizado como cultura de Primavera/Verão, pois esta cultura era bastante sensível ao frio e ao fungo *Ascochyta rabiei*, o que impossibilitava o seu uso como cultura de Outono/Inverno. Na cultura de Primavera/Verão obtinha-se uma baixa produtividade unitária devido a factores limitantes como a baixa disponibilidade de água (défice hídrico) característica desta época de sementeira (Sousa e Duarte, 1990).

O desenvolvimento de variedades tolerantes ao frio e a *Ascochyta rabiei* no International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA) e na Estação Nacional de Melhoramento de Plantas de Elvas (ENMP) permitiram a utilização de grão-de-bico como cultura de Outono/Inverno. Esta época de sementeira permite um maior rendimento da plantação, visto que as condições climatéricas (humidade e temperatura) ao longo do período de desenvolvimento da cultura são mais favoráveis ao crescimento da planta de grão-de-bico (Duarte *et al.*, 1992; Maças, 1994). Contudo, devido às baixas limitações de crescimento resultantes das condições climatéricas e à disponibilidade de água existentes nesta época de sementeira, torna-se fundamental o desenvolvimento da relação simbiótica entre a planta e rizóbio, permitindo a fixação de azoto atmosférico que possibilite um crescimento óptimo da planta de grão-de-bico (Yadav *et al.*, 2007).

Ao utilizar grão-de-bico como cultura de Outono/Inverno surgem também factores que poderão limitar o desenvolvimento da planta, nomeadamente, o encharcamento (Yadav *et al.*, 2007).

O encharcamento reduz a germinação e o desenvolvimento da raiz e caule da planta de grão-de-bico em cerca de 80%. Em regiões da Austrália é considerado como a principal causa de quebra no rendimento de plantações de grão-de-bico devido à redução do número de plantas viáveis por unidade de superfície (Siddique, 2000).

5. Efeito do encharcamento no desenvolvimento de plantas

O encharcamento consiste numa saturação de água no solo e pode ocorrer devido a factores como inundações ou fraca drenagem dos solos, levando a mudanças fisiológicas na planta podendo causar a sua morte (Uppal *et al.*, 2002). Quando o solo está inundado ocorrem mudanças químicas e físicas que podem alterar profundamente as propriedades do solo. O espaço que está normalmente preenchido com ar, fica preenchido de água e os níveis de oxigénio tendem a decrescer, atingido valores abaixo do limiar crítico. Os sistemas aeróbios contêm níveis de oxigénio suficientes ($0,2-0,28 \text{ mol/m}^3 \text{ O}_2$), ao contrário dos sistemas anaeróbios em que os níveis de oxigénio são quase inexistentes ($0,05 \text{ mol/m}^3 \text{ O}_2$) (Yadav *et al.*, 2007). A baixa concentração de oxigénio no solo leva a uma diminuição da absorção de água e nutrientes pelas raízes assim como uma redução de obtenção de energia (cerca de 65 a 97%) e consequente baixa taxa fotossintética. Em resultado das condições de anóxia no solo pode ocorrer a acumulação de compostos tóxicos tais como ácidos orgânicos e álcoois, prejudiciais à planta (Glinski e Stepniewski, 1986; Visser *et al.*, 2003).

A aquisição de azoto é significativamente alterada em plantas leguminosas submetidas a condições de encharcamento. Isto acontece pelo facto de a absorção de nutrientes estar comprometida e porque o encharcamento diminui a nodulação e a actividade específica do complexo enzimático nitrogenase na relação simbiótica entre rizóbio e planta leguminosa (Minchin and Pate, 1975). A formação de nódulos é também retardada pelo aumento da concentração de dióxido de carbono e etileno (Goodlass and Smith, 1979). Em condições de encharcamento prolongado os nódulos e outros tecidos externos da raiz entram em decomposição, podendo levar à cessação da relação simbiótica (Yadav *et al.*, 2007).

O encharcamento é responsável pelo aumento do risco de infecções por fungos como *Fusarium* (Rodrigues *et al.*, 1993) e em solos de pH ácido poderá também aumentar a concentração de ferro e manganês, criando condições de fitotoxicidade, levando à inibição do crescimento da planta (Silva, 1986).

Todos estes fenómenos poderão resultar numa desregulação do balanço entre fitohormonas, levando a um aumento da concentração de etileno e consequente activação de processos dependentes que irão levar à morte da planta (Pezeshki, 1994).

6. Biossíntese e efeito do etileno no desenvolvimento de plantas

As plantas sofrem complexos processos durante o seu ciclo de vida. Esses processos são influenciados e regulados por factores internos e externos. Entre os factores internos a regulação hormonal apresenta um papel crucial, sendo a fitohormona etileno uma das mais importantes e de grande preponderância nos processos de desenvolvimento da planta. (Abeles *et al.*, 1992). O etileno está fortemente relacionado com processos como a germinação de sementes, a diferenciação de tecidos, a formação da raiz e caule primordial, o alongamento da raiz, o início da floração, a síntese de antocianidinas, a abertura da flor, a senescência, o amadurecimento de frutos, a abscisão de folhas e frutos e a resposta ao stresse biótico e abiótico causado à planta. Estes efeitos tornam esta fitohormona numa das biomoléculas de maior importância a nível agronómico e económico (Mattoo e Suttle, 1991; Abeles *et al.* 1992; Frankenberger e Arshad, 1995; Spaink, 1997; Roman *et al.*, 1995; O'Donnell *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998).

A descoberta da via biossintética do etileno por Yang e Hoffman em 1984 foi um marco histórico na investigação e conhecimento desta fitohormona. O etileno é sintetizado a partir do aminoácido metionina através de uma complexa série de reacções químicas, sendo a formação de S-adenosil-L-metionina (Adomet) e consequente transformação em ACC alguns dos passos mais específicos e importantes.

Experiências realizadas “*in vivo*” demonstram que 1- [¹⁴C] metionina é convertido em [¹⁴C] etileno no tecido celular de plantas, e que este deriva dos carbonos 3 e 4 de Adomet (Taiz e Zeiger, 2006). Adomet é sintetizado a partir de metionina e adenosina trifosfato (ATP), através da acção da enzima Adomet sintase (Giovanelli *et al.*, 1980). Após formação de Adomet este vai ser rapidamente convertido em ACC e 5'-metiltioadenosina (MTA), reacção que é catalizada pela enzima ACC sintase (Kende, 1989).

Geralmente a “pool” de metionina no tecido celular das plantas é bastante baixa para que possa sustentar a síntese de etileno, contudo, foi demonstrado por Yang e colaboradores (1984) que após conversão de Adomet em ACC, o grupo metiltio e a fracção de ribose de metiltioadenosina (MTA) são ambos reciclados, permitindo o reabastecimento dos níveis de metionina, possibilitando assim a biossíntese do etileno.

(Miyazaki e Yang, 1987 a,b; Wang *et al.*, 1982). A este ciclo dá-se o nome de ciclo de Yang (**Figura 2**) (Crozier *et al.*, 2000)

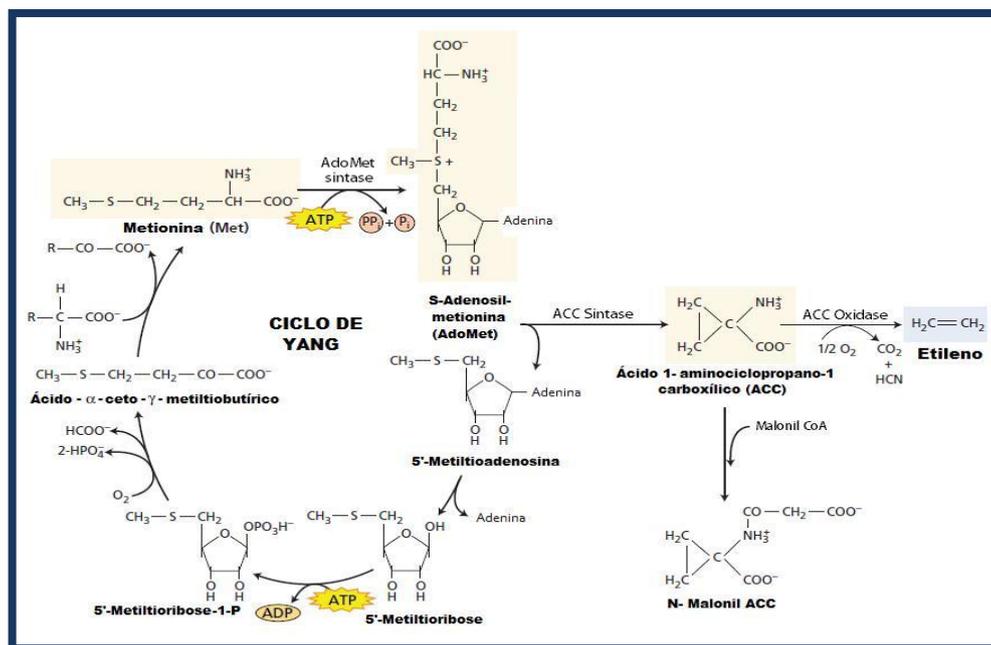


Fig.2- Ciclo de Yang e via biossintética do etileno. (adaptado de McKeon *et al.*, 1995).

O último passo da biossíntese do etileno consiste na oxidação de ACC pela enzima ACC oxidase (John, 1991) tendo como resultado final a formação de etileno, dióxido de carbono e cianido.

Verifica-se que adição exógena de ACC induz a produção de etileno, o que indica que a síntese de ACC pela enzima ACC sintase é o processo limitante da via biossintética do etileno (Yang e Hoffman, 1984; Kende, 1989). No entanto, em alguns casos a oxidação de ACC a etileno pela enzima ACC oxidase poderá ser também um factor limitante.

Sabe-se que em condições de stresse as plantas produzem etileno e que este em elevadas concentrações pode ser prejudicial à planta (Hyodo, 1991).

Em aparente paradoxo, o etileno produzido sob condições de stresse tanto pode aliviar como exacerbar alguns dos efeitos da infecção por organismos patógenos, dependendo da idade e espécie da planta bem como do próprio patógeno (Abeles *et al.*, 1992; Arshad e Frankenberger, 2002; Van Loon e Glick, 2004). Foi então criado um modelo tentando explicar estes efeitos contraditórios da acção do etileno na planta (Stearns e Glick, 2003; Pierik *et al.*, 2006; Van Loon *et al.*, 2006). Segundo este modelo existe um pequeno pico inicial de etileno, que aparece umas horas depois da exposição

da planta ao stresse, e outro pico de maiores dimensões que aparece entre um a três dias depois da exposição ao stresse (**Figura 3**).

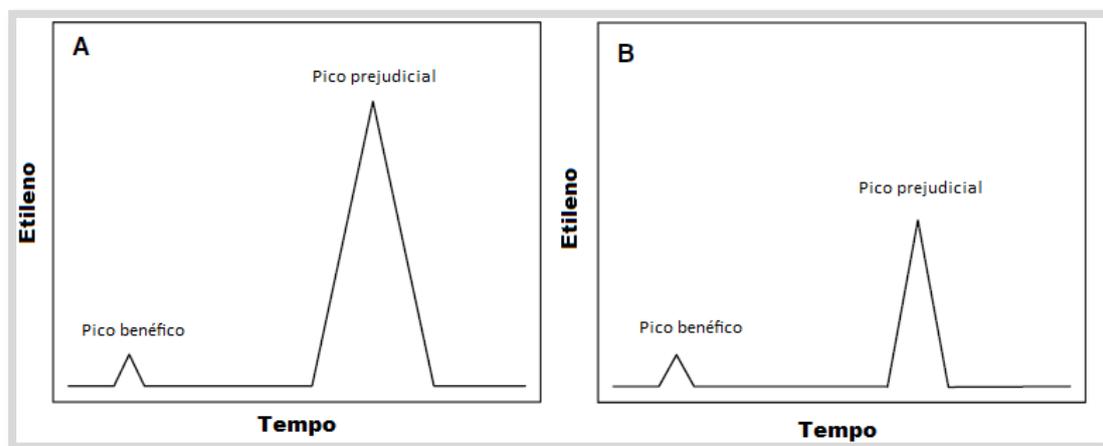


Fig.3- Produção de etileno pela planta em função do tempo (após stresse ambiental). **A-** na ausência de bactéria **B-** na presença de PGPR produtora de ACC desaminase (adaptado de Glick *et al.*, 2007).

O pico inicial é de pequena magnitude e pensa-se que este esteja relacionado com a resposta de protecção primária, levando à activação da transcrição de genes de resistência adquirida ou de genes relacionados com a patogénese (Ciardi *et al.*, 2000; Van Loon e Glick, 2004). Pensa-se que este pico inicial irá levar ao consumo da “pool” de ACC existente nos tecidos da planta (Robison *et al.*, 2001). Por outro lado, o segundo pico é de tão elevada magnitude que vai levar à iniciação de processos como a senescência, clorose e abscisão resultando na inibição de crescimento da planta e até à sua morte. Este segundo pico ocorre devido ao aumento da transcrição de genes de ACC sintase desencadeada por factores ambientais e de desenvolvimento (Yang e Hoffman, 1984).

6.1 Efeito do etileno na nodulação de leguminosas

O etileno inibe a nodulação de várias leguminosas (Hirsch e Fang, 1994) tais como, *Medicago sativa* (Peters e Crist-Estes, 1989), *Pisum sativum* (Goodlass e Smith, 1979; Lee e LaRue, 1992; Guinel e Sloetjes, 2000; Guinel e Geil, 2002) e *Trifolium repens* (Goodlass e Smith, 1979).

Foi também demonstrado por Penmetza e Cook (1997) que a planta *Medicago truncatula*, mutante e insensível ao etileno é mais susceptível à infecção por rizóbio e

assim formar mais nódulos do que a planta “wild type”, não mutante e sensível ao etileno.

Porém, o mecanismo pelo qual o etileno controla a nodulação não é completamente conhecido. Aparentemente o etileno não inibe a colonização da raiz pela bactéria (Guinel e LaRue, 1992), contudo, Lee e La Rue (1992) observaram que o etileno inibe o desenvolvimento do cordão de invasão no córtex radicular de *Medicago sativa* (“luzerna”). Possivelmente, o destino das infecções efectuadas pelo rizóbio no pêlo radicular das plantas leguminosas é regulado pelos níveis de etileno (Abeles *et al.*, 1992; Wisniewski *et al.*, 2000; Guinel e Geil, 2002)

Como a nodulação da raiz de leguminosas depende da densidade de rizóbios no rizoplano e rizosfera (Francoise e Schmidt, 1982; Kucey e Hynes, 1989; Weaver e Frederic, 1974), é possível que o etileno afecte a nodulação através da limitação da proliferação de rizóbio (Tamimi e Timko, 2003). Foi sugerido por Oldroyd *et al.*, (2001) e Tamimi (2003) que o etileno pode modular um processo na via de transdução de sinal dos factores *Nod*, o que indica que o efeito do etileno na nodulação não é restrito à planta e que este pode estar de certo modo envolvido com a bactéria simbiote. O etileno inibe o processo de “*calcium spiking*” responsável pela percepção do factor *Nod* bacteriano, inibindo a consequente expressão de genes como *RIP1* e *ENOD11* responsáveis pela resposta primária da planta ao processo de nodulação (Oldroyd *et al.*, 2001).

Além de inibir os processos de infecção da planta por rizóbio, o etileno também inibe a divisão celular na raiz da planta (Goodlass e Smith, 1979), um processo fundamental para a formação do nódulo primordial.

7. A enzima ACC desaminase (E.C. 3.5.99.7)

A enzima ACC desaminase (E.C. 3.5.99.7) é responsável pela conversão irreversível de ACC, precursor imediato de etileno em plantas, em amónia e α -acetobutirato (**Figura 4**) (Honma e Shimomura, 1978).

É uma enzima multimérica (que pode existir em forma homodimérica ou homotrimérica) com uma massa molecular de cerca de 35-42 kDa por subunidade. A ACC desaminase utiliza como seu principal co-factor 5-fosfato piridoxal (PLP), ao qual se liga na razão de uma mole por cada subunidade trimérica enzimática (Honma, 1985).

Dentro do grupo das enzimas dependentes de fosfato piridoxal (Walsh *et al.*, 1981) a ACC desaminase encontra-se no grupo das D-cisteína desulfidrases (Honma, 1985).

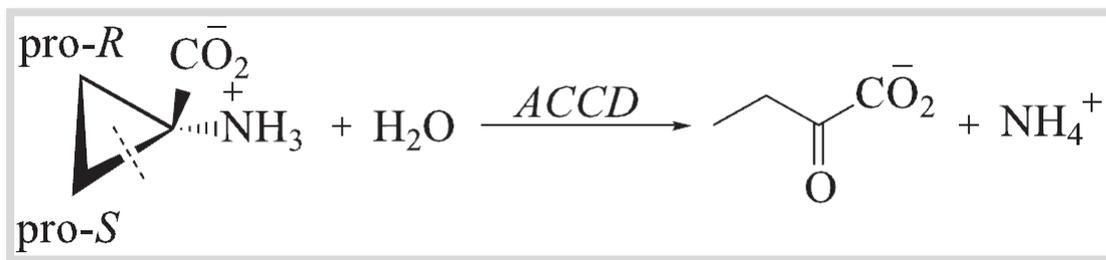


Fig.4 Degradação de ACC pela enzima ACC desaminase (ACCD), formando α -cetobutirato e amónia como produtos de reacção (adaptado de Hontzeas *et al.*, 2004).

O ACC exsudado pela planta é o substrato da enzima ACC desaminase. Os valores de *K_m* para ACC deaminase variam entre 1,5 e 17,5 mM, dependendo do organismo que a produz, indicando que a enzima não se liga ao substrato com elevada afinidade (Honma e Shimomura, 1978; Klee e Kishore, 1992; Jacobson *et al.*, 1994; Hontzeas *et al.*, 2004). A ACC desaminase encontra-se no citoplasma do organismo que a produz (Jacobson *et al.*, 1994).

Enquanto vários D-aminoácidos como D-serina ou D-cisteína podem actuar como substrato de ACC desaminase (embora de forma menos eficaz que ACC) outros como L-serina ou L-alanina são inibidores da sua actividade enzimática (Glick, 2005).

A temperatura óptima para a actividade da ACC desaminase é de cerca de 30 a 35°C o seu pH óptimo 8,5 (Jacobson *et al.*, 1994; Honma e Shimomura, 1978; Jia *et al.*, 1999; Hontzeas *et al.*, 2004).

ACC desaminase possui dois resíduos de aminoácidos que são fundamentais para o seu funcionamento, um deles um grupo reactivo tiol no aminoácido cisteína 162 localizado no intervalo interno entre os dois domínios da enzima e outro num local de ligação para fosfato piridoxal no aminoácido lisina 51 (Glick, 2005).

7.1 Distribuição e origem da ACC desaminase

A enzima ACC desaminase foi detectada num largo número de diferentes organismos do solo, entre eles vários géneros de bactérias (Klee *et al.*, 1991; Sheehy *et*

al., 1991; Jacobson *et al.*, 1994; Glick *et al.*, 1995; Campbell e Thomson, 1996; Burd *et al.*, 1998; Minami *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1999; Belimov *et al.*, 2001; Mayak *et al.*, 2004; Bababola *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003 a,b; Dey *et al.*, 2004; Uchiyumi *et al.*, 2004; Belimov *et al.*, 2005; Hontzeas *et al.*, 2005; Blaha *et al.*, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2006) e fungos (Honma e Shimomura, 1978; Honma, 1993).

Apesar da sua relativa abundância, por vezes em organismos do mesmo género e espécie a sua distribuição não é uniforme, ou seja, algumas estirpes possuem e outras não. Por exemplo, enquanto algumas estirpes de *Azospirillum* possuem o gene *acdS* (gene codificando a enzima ACC desaminase), (Blaha *et al.*, 2006), outras estirpes do mesmo género *Azospirillum* não o possuem (Holguin e Glick, 2001). Estas observações sugerem que a origem e transferência do gene *acdS* são factores de extrema importância na sua distribuição e prevalência.

A origem do gene *acdS* é pouco conhecida, contudo segundo um modelo elaborado por Glick (2005), pensa-se que este gene possa ter surgido por evolução convergente através da modificação e/ou duplicação de genes bacterianos codificando desaminases ou aminotransferases dependentes de fosfato piridoxal. Este modelo também prevê uma existência limitada de genes *acdS* visto que o número de genes pré-existentes, passíveis de sofrer mutações e assim codificar ACC desaminase, é relativamente baixo (Glick, 2005).

Todavia, as bactérias do solo podem adquirir genes *acdS* por outros mecanismos que não apenas por mutações fortuitas. A transferência de genes entre bactérias é um processo bastante comum e conhecido (Bertolla e Simonet, 1999).

Quando a árvore filogenética de bactérias que expressam ACC desaminase, baseada na sequência de 16S rDNA é comparada com a árvore filogenética das mesmas bactérias baseada nas sequências de genes *acdS*, observa-se que estas são bastante distintas entre si (Hontzeas *et al.*, 2005). Por exemplo: as ACC desaminases codificadas por *Pseudomonas* estão distribuídas por toda a árvore em vez de formarem um grupo específico como era esperado. Além disso, ACC desaminases de organismos bastante diferentes e distintos de bactérias, como é o caso de fungos, não formam um grupo externo específico. Estas observações sugerem que os genes *acdS* sejam transmitidos lateralmente (horizontalmente) (Boucher *et al.*, 2003).

Na verdade, muitos dos genes *acdS* hoje conhecidos não integram o DNA cromossomal dos organismos que os possuem. Em vez disso, encontram-se em plasmídeos relativamente grandes e estáveis. Geralmente é muito mais acessível (tanto em laboratório como no meio ambiente) transferir DNA plasmídico de um organismo para outro, em vez de DNA cromossomal (Bertolla *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2006). Se muitos destes genes *acdS* são encontrados em plasmídeos é bastante provável que em algumas bactérias estes sejam adquiridos por transferência horizontal de genes.

Se em algumas bactérias os genes *acdS* foram adquiridos por transferência horizontal, então é possível que os seus elementos de regulação transcricional também o sejam. A justaposição dos genes *acdS* e *acdR* (gene codificando proteína Lrp), característica do modelo de regulação transcricional de *Pseudomonas putida* UW4, foi também encontrada noutras bactérias como *Agrobacterium tumefaciens* d3, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, *Variovarax paradoxus* 5C2 e *Achromobacter xylosoxidans* A551 (Hontzeas *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003^a; Trott *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002). Este facto poderá tornar mais consistente a noção de que toda a região de DNA contendo o gene estrutural *acdS* em conjuntos com os genes reguladores poderá ser transmitida e adquirida por transferência horizontal de genes.

A presença da enzima ACC desaminase totalmente funcional em plantas como *Arabidopsis* (Glick *et al.*, 2007) poderá também servir de evidência e suporte da possibilidade de transferência horizontal de genes. Esta e outras plantas podem ter adquirido o gene *acdS* de bactérias com as quais normalmente se associam.

7.2 Prevalência da enzima ACC desaminase em rizóbio

Em rizóbio, foram detectadas várias estirpes possuidoras do gene *acdS*. Um estudo realizado por Ma *et al.*, (2003^b) demonstrou que 5 em 13 estirpes de rizóbio testadas expressavam a enzima ACC desaminase na sua forma activa. Através deste estudo observou-se também que os genes *acdS* destas estirpes (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53, 128C53K, 128C53G e 99A1) são altamente similares ao gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 (Shah *et al.*, 1998), embora a actividade da enzima seja bastante inferior à actividade da ACC desaminase de *Pseudomonas putida* UW4 ($\approx 1 \mu\text{mol/mg/h}$ vs. $\approx 20 \mu\text{mol/mg/h}$).

Um estudo recente demonstrou a presença do gene *acdS* em 27 de 233 novos isolados de *Rizhobium* spp. de diversas localizações no sul e centro de Saskatchewan, Canadá (Duan *et al.*, 2006).

O gene *acdS* foi também detectado em estirpes do género *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (Stiens *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

Em *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 foi detectada a presença de uma sequência codificando uma ACC desaminase (Kaneko *et al.*, 2000). A sequência de nucleótidos apresenta 62% de identidade e a sequência deduzida de aminoácidos apresenta 79% de similaridade relativamente à enzima ACC desaminase de *P.putida* UW4. Em condições de vida livre *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 não produz ACC desaminase, no entanto, a enzima é expressa nos nódulos quando a bactéria se encontra na sua forma simbiótica (Uchiumi *et al.*, 2004). Sullivan e colaboradores (2002) demonstraram que em *Mesorhizobium loti* R7a o gene *acdS* está localizado numa ilha simbiótica (conjunto de genes simbióticos) perto de genes associados à fixação de azoto.

7.3 Regulação transcricional do gene *acdS*

Um estudo sobre a actividade da ACC desaminase de *Pseudomonas putida* GR12-2 demonstrou que o tempo necessário para a total indução da enzima é superior ao período de geração da bactéria (Jacobson *et al.*, 1994), revelando que o mecanismo de indução de ACC desaminase e o seu modo de regulação é relativamente complexo.

Subsequentemente, a análise de dados relativos à sequência de DNA da região a montante do gene estrutural de ACC desaminase (*acdS*) de *Pseudomonas putida* UW4, indica que este segmento de DNA contém um local de ligação CRP (proteína receptora de AMP cíclico), um local de ligação FNR (proteína reguladora da redução fumarato-nitrato) (um regulador transcricional anaeróbio), um local de ligação LRP (*leucine responsive regulator protein*), uma “open reading frame” (ORF) codificando uma proteína Lrp e três sequências putativas para promotores, um controlando o gene regulador de ACC desaminase (*acdR*) e outros dois controlando o gene *acdS* (Grichko e Glick, 2000; Li e Glick, 2001). Foi demonstrado que todos estes elementos estão envolvidos na regulação transcricional de ACC desaminase, com o promotor do gene

estrutural *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 sob controlo transcricional da proteína reguladora Lrp (**Figura 5**).

Baseado em dados de outros sistemas assume-se que Lrp encontra-se activa na forma de um octâmero. (Leonard *et al.*, 2001). Quando em excesso Lrp liga-se a uma Lrp “box” localizada na região imediatamente a montante do gene *acdR*, inibindo a sua transcrição.

A proteína Lrp, em forma de octâmero, pode-se ligar também a um complexo constituído por ACC e outra proteína denominada AcdB (Glick *et al.*, 2007). Em conjunto, Lrp e o complexo ACC-AcdB, controlam e activam a transcrição de *acdS*. Após a síntese de ACC desaminase e consequente “folding” para a sua forma activa, ACC vai ser hidrolisado havendo a formação de amónia e α -cetobutirato (um precursor de aminoácidos de cadeia ramificada como a leucina). Quando a célula acumula níveis elevados de leucina, este aminoácido vai-se ligar ao octâmero Lrp causando a sua dissociação a uma forma dimérica inactiva, inibindo então a futura transcrição de *acdS*. Este complexo modo de regulação dita que ACC desaminase é sintetizada apenas quando necessária e de alguma forma em quantidades limitadas.

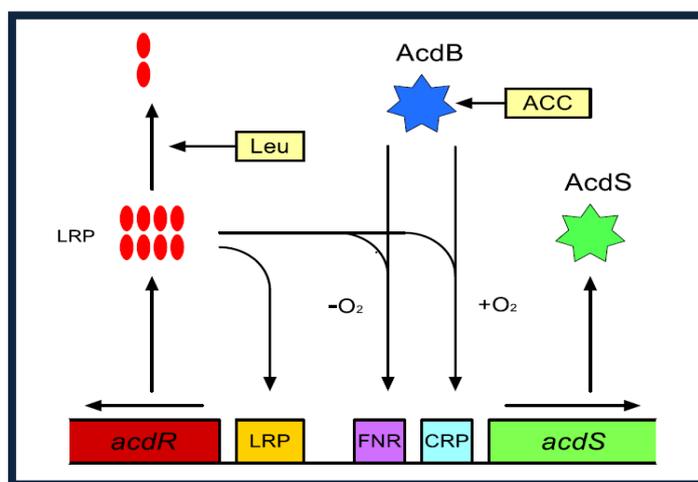


Fig 5.- Modelo de regulação transcricional de ACC desaminase de *Pseudomonas putida* UW4 (adaptado de Glick *et al.*, 2007).

Embora todos os detalhes sobre o mecanismo de regulação transcricional não estejam totalmente esclarecidos, genes codificantes da proteína Lrp foram encontrados a montante de vários genes estruturais *acdS* em várias bactérias, sugerindo que este modo

de regulação transcricional é a característica comum no funcionamento de diversas ACC desaminases (Glick *et al.*, 2007).

Além da regulação por Lrp, alguns genes *acdS* podem ser regulados por outros promotores independentes, como é o caso do gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 que está sob controlo do promotor *NifA2* (Nukui *et al.*, 2006) e que é apenas expresso no interior dos nódulos formados na planta (Uchiumi *et al.*, 2004). Neste caso pensa-se que a expressão da enzima ACC desaminase só ocorre após a ligação da proteína expressa por *NifA2* a um local de reconhecimento específico (UAS) que está localizado a jusante de um promotor σ^{54} (Nukui *et al.*, 2006) (**Figura 6**).



Fig.6- Esquema representativo da região a jusante e a montante do gene *acdS* (*mlr5932*) de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. UAS- local de reconhecimento específico. (adaptado de Uchiumi *et al.*, 2004).

Especula-se que a expressão do gene *acdS* apenas dentro dos nódulos esteja relacionada com a tentativa de decréscimo da taxa de senescência dos mesmos, visto que a fixação de azoto e a sua grande necessidade energética podem causar stresse na planta, levando assim a um aumento dos níveis de etileno. Sendo assim, ACC desaminase é expressa dentro dos nódulos evitando um aumento excessivo dos níveis de etileno, promovendo então a fixação de azoto (Glick *et al.*, 2007).

7.4 Níveis de actividade da enzima ACC desaminase

Existe uma ampla discrepância nos níveis de actividade das diferentes ACC desaminases. A actividade enzimática depende do organismo que a produz e conceptualmente é possível criar dois grupos de organismos com base nos níveis de expressão da enzima. Os organismos que expressam altos níveis de ACC constituem um grupo e são aqueles que tipicamente se ligam à planta de uma forma inespecífica e a variadas superfícies da mesma (raízes, caules ou folhas). Este grupo inclui a maior parte dos organismos da rizosfera, filosfera e também endófitas. Todos eles actuam

diminuindo os níveis globais de etileno na planta, assimilando o ACC que é produzido como consequência de algum tipo de stresse causado à planta (Glick, 2005)

Por outro lado, existe o grupo constituído por organismos que expressam baixos níveis de ACC deaminase, que se ligam à planta de modo específico e apenas em determinados tecidos ou órgãos. Este grupo inclui a maior parte, senão, todos os rizóbios. Estes organismos não promovem a diminuição dos níveis gerais mas previnem o aumento localizado dos níveis de etileno. A infecção por rizóbio e consequente nodulação causa apenas um ligeiro aumento dos níveis de etileno logo não é necessária grande actividade enzimática para prevenir esse fenómeno (Glick, 2005).

7.5 Diminuição dos níveis de etileno pela ACC desaminase

Um dos mecanismos mais importantes e utilizados pelas PGPR, para estimular o crescimento de plantas, é a diminuição dos níveis de etileno da planta. (Hall *et al.*, 1996). Segundo Glick (1998) este mecanismo segue provavelmente uma determinada sequência de eventos que estão bastante relacionados entre si. Foi então proposto por este autor o modelo representado na **Figura 7**.

Uma porção significativa de ACC poderá ser exsudada pela raiz ou semente da planta e consecutivamente adquirida pela bactéria, que possuindo a enzima ACC desaminase vai hidrolisar ACC em amónia e α -cetobutirato. O consumo e subsequente hidrólise de ACC pela bactéria conduz a uma diminuição da concentração externa de ACC na planta. Para conseguir manter o equilíbrio entre a concentração interna e externa, a planta necessita de libertar uma maior quantidade de ACC. Este aumento na libertação de ACC é bastante benéfico para a bactéria pois permitirá que esta prolifere sob condições em que outras bactérias não conseguem sobreviver (nomeadamente em meios onde ACC é a única fonte de azoto) tornando-a mais competitiva, com maiores capacidades de crescimento e adaptação.

Segundo Glick (1997) existem pelo menos duas consequências directas resultantes da diminuição dos níveis de ACC dentro da planta: **A redução dos níveis de etileno** e consequente **diminuição da inibição do crescimento e proliferação celular**.

Assim sendo, plantas que formem relações simbióticas com PGPR's que possuam a enzima ACC desaminase, deverão ter raízes mais longas e possivelmente um maior desenvolvimento da sua parte aérea.

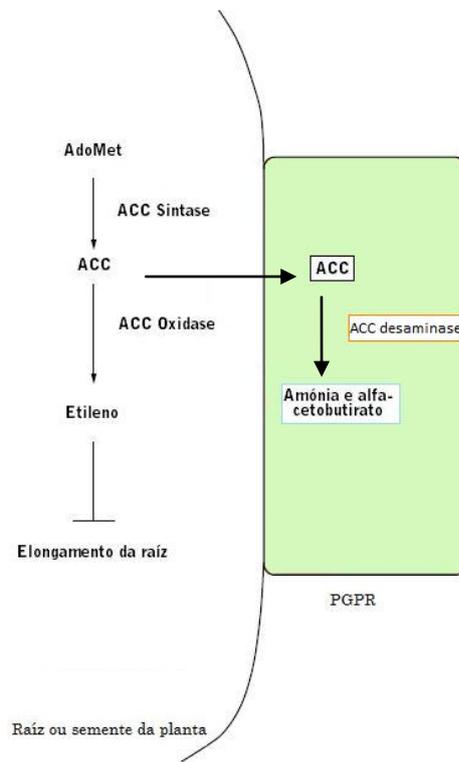


Fig.7 - Esquema representativo do mecanismo pelo qual a PGPR se liga à raiz ou semente de uma planta, diminui a concentração de etileno e assim previne a inibição do alongamento da raiz. As setas indicam processos físicos ou químicos e o símbolo \perp indica inibição. AdoMet- S-adenosil-metionina; ACC- ácido 1 aminociclo-propano-1-carboxílico (adaptado de Glick *et al.*, 1998).

8. Transformação de bactérias com o gene *acdS*

A transformação de estirpes bacterianas com genes *acdS* e as suas regiões reguladoras demonstrou ser uma importante e valiosa ferramenta na medida em que veio possibilitar o aumento da eficiência, competitividade e consequente utilização dessas estirpes (Holguin e Glick, 2001, 2003; Ma *et al.*, 2004).

Estirpes de *E.coli* e *Pseudomonas* que não expressavam ACC desaminase foram transformadas com o gene de *Pseudomonas putida* UW4 e consequentemente passaram a promover um aumento do alongamento das raízes de *Brassica campestris* (Shah *et al.*, 1998). A taxa de eficiência de alguns agentes de biocontrole (algumas bactérias do género *Pseudomonas*) também foi significativamente aumentada após transformação como o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 (Wang *et al.*, 2000).

Contudo, o complexo sistema de regulação transcricional que controla a expressão de muitos genes *acdS* pode não ser operacional em todas as bactérias. Quando estirpes de *Azospirillum* (não possuidoras de ACC desaminase) foram transformadas com o gene *acdS* de *Pseudomonas* sob o controlo do gene regulador *acdR*, verificou-se que estas não expressavam ACC desaminase (Holguin e Glick, 2001). Porém, quando a região reguladora do gene *acdS* de *Pseudomonas* foi substituída pelos promotores *lac* ou *tet* de *E. coli*, a enzima passou a ser expressa em altos níveis e a capacidade de promoção de crescimento da planta pela bactéria foi significativamente aumentada (Holguin e Glick, 2001, 2003).

A transformação de *Sinorhizobium meliloti* (único registo bibliográfico de transformação de rizóbio com gene *acdS*) com o gene *acdS* de *Rhizobium leguminosarum* veio permitir à bactéria transformada aumentar a sua capacidade em nodular alfafa e estimular o crescimento da planta em cerca de 35 a 40%, em comparação com a estirpe de *Sinorhizobium meliloti* “wild type” não transformada (Ma *et al.*, 2004).

Objectivo geral

- Obtenção de estirpes de *Mesorhizobium* de grão-de-bico transformadas com gene *acdS* capazes de promover o crescimento de *Cicer arietinum*.

Objectivos específicos

- Detecção do gene *acdS* em estirpes de *Mesorhizobium*
- Transformação de estirpes de *Mesorhizobium* de grão-de-bico com gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 clonado no vector de expressão pRK415, por conjugação triparental.
- Medição da actividade enzimática de ACC desaminase de estirpes de *Mesorhizobium* “wild type” e transformadas
- Avaliar a influência da ACC desaminase na nodulação e na actividade do complexo enzimático nitrogenase
- Verificar a capacidade de uma estirpe transformada em promover o crescimento da planta de grão-de-bico em condições normais e de stresse (encharcamento)

Material e Métodos

1. Detecção de genes *acdS* em estirpes de *Mesorhizobium*

1.1 Extracção rápida de DNA

Para uma rápida e simples obtenção do DNA total das estirpes de *Mesorhizobium* em estudo, foi utilizado o método de extracção de DNA descrito por Rivas *et al.*, 2001. As estirpes de *Mesorhizobium* foram inoculadas e crescidas em meio TY. Posteriormente foi recolhida uma ansada de células da cultura procedendo-se em seguida à sua suspensão em 200 µl de H₂O miliQ. Esta solução foi centrifugada a 12000 r.p.m durante 2 minutos. O pellet obtido foi lavado com 200 µl 0.1% Sarkosyl e novamente centrifugado sendo desprezado o sobrenadante. O DNA foi então extraído com 100 µl 0.05 M NaOH através de fervura em “banho-maria” durante 4 minutos. Após fervura, o tubo contendo o DNA foi imediatamente colocado em gelo. Em seguida adicionaram-se 600 µl de H₂O miliQ e procedeu-se à centrifugação a 4000 r.p.m durante 3 minutos para remover resíduos celulares indesejados. Finalmente foram transferidos 400 µl do sobrenante obtido para um novo tubo eppendorf que foi guardado a -20°C.

1.2 Isolamento do DNA total

Sendo necessário DNA em maior quantidade e qualidade para procedimentos mais específicos e sensíveis procedeu-se ao isolamento do DNA total das estirpes utilizando o Kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. Após isolamento, o DNA total foi quantificado utilizando o kit Qubit Quantitation Platform (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante.

1.3 Detecção do gene *acdS* em isolados de *Mesorhizobium* através do método de PCR

Na detecção do gene *acdS* nas estirpes nativas de *Mesorhizobium* capazes de nodular grão-de-bico e nas estirpes tipo estudadas (**anexo 1 e 2**), foram utilizados os “primers” específicos *acdS* F (5'-GGCAAGGTCGACATCTATGC-3') (Duan *et al.*, 2006) e *acdS* R2 (5'-GCATCGATTTGCCCTCATAG-3') (Brígido, C., resultados não publicados) desenhados para amplificar uma sequência baseada no gene *acdS* de

Mesorhizobium loti MAFF303099 (o único gene *acdS* conhecido em estirpes do género *Mesorhizobium*). Os “primers” foram sintetizados pela StabVida (Portugal).

Os 25 µl de mistura utilizados na reacção continham 2,5 µl de 10X Taq “DNA Polymerase Buffer”, 2 µl de 25mM MgCl₂, 0,5 µl de 10 mM dNTP’s, 5 µl de cada primer (5 pmol), 0,1 µl de DNA Taq Polymerase (1 U) (Fermentas), 4,9 µl de H₂O MilliQ e 5 µl de DNA (aproximadamente 100 pg) (extraído pelo método descrito em 1.1). O DNA foi amplificado no termociclador “T Personal Cycler” (Biometra) utilizando o seguinte programa: 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 50 segundos de “primer annealing” a 48°C e 1 minuto de alongamento a 72°C, e um alongamento final durante 5 minutos a 72°C.

Após a reacção foram adicionados 3 µl de “loading buffer” (0.25% Orange G, 30% glicerol) a 5 µl de mistura de reacção e as bandas separadas por electroforese em gel de agarose 1% (w / v) (Invitrogen) no tampão 0.5X Tris-borato (TBE) a 80V durante 1 hora. Foi utilizado o marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb DNA Plus (Fermentas) como referência.

Os géis foram corados com brometo de etídio (QBiogene) (0,5 mg / ml) e fotografados sob luz ultra-violeta utilizando uma câmara Kodak DC 120 e o software Kodak Digital Science 1D (versão 2.0.3, Eastman Kodak Company).

1.4 Amplificação do 16S rDNA

Na amplificação do 16S rDNA das estirpes nativas de *Mesorhizobium* de grão-de-bico nas quais foi detectado o gene *acdS*, foram utilizados os “primers” específicos Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (Young *et al.*, 1991) e Y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC-3') (Laranjo *et al.*, 2004). Este método foi apenas utilizado para confirmar a identidade dos isolados utilizados no processo de transformação e dos isolados onde foi detectada a presença de um gene *acdS*.

Os 50 µl de mistura utilizados na reacção continham 5 µl de 10X Taq “DNA Polymerase Buffer”, 2,5 µl de 25mM MgCl₂, 1 µl de 10 mM dNTP’s, 3,2 µl de cada primer (5 pmol), 0,2 µl de DNA Taq Polymerase (2 U) (Fermentas), 34,9 µl de H₂O MilliQ e 5 µl de DNA (aproximadamente 100 pg) (extraído pelo método descrito em 1.1). O DNA foi amplificado no termociclador “T Personal Cycler” (Biometra) utilizando o seguinte programa: 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 29 ciclos de

desnaturação a 94°C durante 1 minuto, 1,5 minutos de primer “annealing” a 52°C e 1 minuto de alongamento a 72°C, e um alongamento final durante 3 minutos a 72°C.

As condições de electroforese e aquisição de imagem de gel foram semelhantes ao procedimento descrito em 1.3.

1.5 Análise Filogenética

A análise filogenética do gene *acdS* e do 16S rDNA foi realizada utilizando diversos programas de Bioinformática:

BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.05) (Hall, T., 1999) para a análise e edição de sequências nucleotídicas, ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) para o alinhamento de sequências e Molecular Evolutionary Genetics Analysis 4 (versão 3.1) (Tamura *et al.*, 2007) para a construção das árvores filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de “neighbor-joining” utilizando o modelo de dois parâmetros de Kimura (1980) e um valor de “bootstrap” de 1000 repetições.

Além destes programas foram também utilizadas bases de dados como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e EXPASY (<http://www.expasy.ch/>).

1.6 Hibridação pelo método de Southern

O método de hibridação de Southern (1975) foi utilizado a fim de se avaliar o número de cópias do gene *acdS* presente nas estirpes de *Mesorhizobium*. Este método foi também utilizado para a detecção de genes *acdS*.

A análise do tamanho dos fragmentos obtidos foi realizada através da medição da distância (cm) do fragmento ao poço e posterior comparação com o marcador de peso molecular.

1.6.1 Marcação da sonda

No método de hibridação de Southern foi utilizado como sonda o gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 amplificado previamente por PCR. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) segundo as recomendações do fabricante. Em seguida o DNA foi marcado

com digoxigenina-11-dUTP utilizando o Kit DIG-High Prime DNA Labeling (Roche Applied Science). Foi utilizada 1 µg de DNA previamente desnaturado por fervura (durante 10 min) ao qual se adicionou posteriormente 4 µl de DIG-High Prime (Roche Applied Science). Após incubação “overnight” a reacção foi inibida por aquecimento a 65°C durante 10 minutos.

1.6.2 Digestão com enzima de Restrição *Bam*HI

Na digestão com enzima de restrição foram utilizadas 2 µg de DNA total (obtido pelo processo descrito em 1.2) que foi então digerido durante a noite a 37°C, com 30 unidades da enzima de restrição *Bam*HI (Invitrogen) no tampão apropriado. Após digestão procedeu-se à inactivação da enzima através da sua desnaturação a 65°C durante 15 min.

À mistura de digestão foram adicionados 10 µl de “loading buffer” (0.25% Orange G, 30% glicerol) e as amostras foram então aplicadas nos poços. As bandas de DNA foram separadas por electroforese em gel de agarose 0,8% (w / v) (Invitrogen) no tampão Tris-acetato (TAE) (40 mM Tris, 40 mM de ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,3) (Sambrook e Russell, 2001) a 80V durante 5 horas. Como referência foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Plus (Invitrogen).

1.6.3 Transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose

Após separação dos fragmentos de DNA por electroforese, o gel foi cortado convenientemente e incubado em solução de desnaturação (1,5M NaCl; 0,5M NaOH) durante 45 minutos. Em seguida o gel foi lavado com água destilada e incubado em solução de neutralização (1M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5M NaCl) para facilitar a transferência do DNA para a membrana. A transferência do DNA para a membrana foi realizada por capilaridade, onde o gel foi colocado sobre uma banda de papel 3MM Whatman embebido e em contacto com uma solução tampão 10x SSC (1.5 M NaCl; 0.15 M citrato trisódico, pH 7,0) (Sambrook e Russel 2001). Por cima do gel foi colocada uma membrana de nitrocelulose (Roche Applied Science), 3 folhas de papel 3MM Whatman e folhas de papel absorvente cortadas à medida. Foram aplicadas aproximadamente 600 g de peso em cima do conjunto de transferência de forma a permitir a passagem do DNA do gel para a membrana. O processo ocorreu “overnight”.

Finalizada a transferência o DNA foi fixado à membrana através da incubação a 80°C durante 2 horas.

1.6.4 Hibridação

Após a fixação do DNA à membrana procedeu-se ao processo de pré-hibridação, onde a membrana foi colocada numa garrafa de hibridação (Biometra) em conjunto com 15 ml da solução Dig Easy Hyb (Roche Applied Science) a 42°C durante 30 minutos. Em seguida retirou-se a solução e adicionaram-se mais 15 ml de DIG Easy Hyb contendo a sonda *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 previamente desnaturada, numa concentração final de aproximadamente 25 ng/ml. Prosseguiu-se a incubação a 42°C durante a noite, com agitação constante.

Depois do processo de hibridação a membrana foi lavada com 2X SSC e 0.1% SDS (pH 7,0) à temperatura ambiente durante 2 x 5 minutos, seguido de uma segunda lavagem com 0.5X SSC e 0.1% SDS (pH 7,0) a 68°C durante 2 x 15 minutos.

1.6.5 Detecção

Seguido à hibridação e lavagens restritivas procedeu-se à detecção imunológica do sinal, através do sistema digoxigenina-anticorpo-fosfatase alcalina.

Lavou-se a membrana com tampão de lavagem (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl; pH 7,5; 0.3% (v/v) Tween 20) durante 5 minutos, que em seguida foi incubada durante 30 minutos em cerca de 50 ml de “Blocking Solution” (Roche Applied Science). Posteriormente a membrana foi incubada em cerca de 50 ml de solução de Anticorpo (anti-digoxigenina-Fosfatase alcalina) (Roche Applied Science) durante 30 minutos. Após incubação a membrana foi lavada com tampão de lavagem 2 x 15 minutos e equilibrada em 20 ml de tampão de detecção (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9,5) durante 5 minutos.

Com a ajuda de uma pinça a membrana foi então transferida para um saco de plástico transparente onde foi aplicado 1 ml de solução CDP-Star (Roche Applied Science). A solução foi espalhada por toda a membrana com o auxílio de uma pipeta. Removeram-se todas as bolhas e selou-se o saco. O saco contendo a membrana foi posto em contacto com filme raio-x (Kodak) durante o tempo necessário. Em seguida o filme raio-x foi embebido numa solução de revelação (Kodak) durante o tempo necessário para a revelação do sinal e posteriormente numa solução de fixação (Kodak)

durante cerca de 2-3 minutos. O processo de revelação foi realizado em condições de ausência de luz.

2. Determinação da actividade enzimática da ACC desaminase

A determinação da actividade enzimática da ACC desaminase foi realizada segundo o método descrito por Duan *et al.*, 2006.

Este método consiste na medição da quantidade de α -cetobutirato que é produzido pela clivagem de ACC pela enzima ACC desaminase (Honma e Shimomura, 1978). A quantidade (μmol) de α -cetobutirato produzida é determinada através da comparação da leitura de absorvância a 540 nm entre a amostra e um padrão de α -cetobutirato de concentrações conhecidas (Penrose e Glick, 2003). Foram efectuados duplicados em cada processo de medição.

A quantificação final da actividade enzimática é obtida através da relação entre quantidade de α -cetobutirato produzida/ proteína total/ tempo de incubação.

2.1 Preparação dos padrões

Os padrões foram obtidos através de uma solução stock de 100 mM de α -cetobutirato (Calbiochem) preparada em 0,1M Tris-HCl, pH 8,5. Foram preparados padrões de concentração 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mM. A cada 500 μl de solução padrão de foram adicionados 400 μl de 0,56N HCl e 150 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,2% 2,4-dinitrofenilhidrazina em 2N HCl). A solução foi misturada por “vortex” à velocidade máxima durante 5 segundos e em seguida incubada a 30°C durante 30 minutos. Neste espaço de tempo o α -cetobutirato é derivado numa fenilhidrazona.

Após incubação adicionou-se 1 ml de 2N NaOH à solução, que leva a um desenvolvimento de cor da fenilhidrazona. A absorvância a 540 nm foi medida num espectrofotómetro (Cecil CE1021). Foi realizado um controlo negativo (todos os reagentes de reacção excepto α -cetobutirato) do qual o valor de absorvância a 540 nm foi medido e subtraído aos valores padrão, gerando-se em seguida uma curva padrão.

2.2 Indução da actividade da ACC desaminase

As estirpes de *Mesorhizobium* a estudar assim como o controlo positivo (*Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* 128C53K) e negativo (*Mesorhizobium loti*

MAFF303099) foram crescidas em meio líquido TY (5 g/L triptona; 3 g/L extracto de levedura; 1,3 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (com 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina quando aplicável) durante 3 dias (até atingir fase estacionária de crescimento).

Após centrifugação a 10000 g durante 5 min, o pellet foi recolhido e lavado por 2 vezes com 0,1M Tris-HCl, pH 7,5. Em seguida o pellet foi ressuscitado em 1 ml de 0,1M Tris-HCl pH 8,5 e adicionado a 9 ml de meio mínimo M9 modificado sem fonte de azoto (5,8 g/L Na_2HPO_4 ; 3 g/L KH_2PO_4 ; 0,5 g/L NaCl; 0,25 mM CaCl_2 ; 1 mM MgSO_4 ; 0,15% glucose; 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotina) (Miller, J., 1972) suplementado com 0,5 mM de ACC (Calbiochem) e com o respectivo antibiótico. Esta cultura foi incubada a 28°C durante 40-48 horas a fim de induzir a actividade da enzima ACC desaminase.

2.3 Preparação das amostras a quantificar

Seguido da indução da actividade enzimática, procedeu-se à preparação das amostras para determinação da quantidade de α -cetobutirato produzido e também da quantidade de proteínas totais.

A cultura crescida em meio mínimo M9 modificado sem fonte de azoto foi centrifugada a 10000 g durante 5 minutos. O pellet foi lavado 2 vezes com 0,1M Tris-HCl pH 7,5 e em seguida ressuscitado em 400 μl de 0,1M Tris-HCl, pH 8 num tubo de 1,5 ml.

Em seguida adicionaram-se 20 μl de tolueno e a solução foi misturada por “vortex” à velocidade máxima durante 30 segundos. Desta solução foram retiradas 3 alíquotas de 50 μl para a medição da actividade da ACC desaminase (duas repetições e um controlo negativo) e uma alíquota de 100 μl para a quantificação de proteínas totais.

2.4 Medição da quantidade de α -cetobutirato produzido

Foram colocados 50 μl de amostra preparada num novo tubo de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 5 μl de uma solução 0,5M de ACC previamente obtida. A mistura foi então misturada por “vortex” à velocidade máxima durante 5 segundos e em seguida incubada a 30°C durante 30 minutos.

Após incubação foram adicionados 500 μl de 0,56M HCl e a mistura foi centrifugada a 14000 r.p.m durante 5 min. Foram retirados 500 μl de sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionados 400 μl de 0,56M HCl e 150 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Esta solução foi misturada por “vortex” durante 5 segundos e

incubada a 30°C durante 30 minutos. Em seguida adicionou-se 1 ml de NaOH e observou-se o desenvolvimento de cor. A mistura foi então decantada para uma “cuvette” de 3 ml e em seguida procedeu-se à leitura de absorvância a 540 nm.

O mesmo procedimento foi realizado para o controlo negativo (amostra sem adição de ACC). Foram realizados duplicados de cada medição.

Aos valores de absorvância da amostra foi subtraído o valor de absorvância do “branco” (todos os reagentes sem a presença da amostra) assim como o valor do controlo negativo. Os resultados foram obtidos através da extrapolação com a curva padrão.

2.5 Quantificação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford (1976).

Foram utilizados 100 µl de amostra previamente preparada aos quais foram adicionados 100 µl de 0,1M NaOH. A solução foi fervida em “banho-maria” durante 10 minutos, a fim de ocorrer a lise celular. Após a fervura a solução foi arrefecida à temperatura ambiente.

Encheram-se “cuvettes” com 3 ml de reagente de Bradford (Sigma) e em seguida adicionou-se 100 µl da solução lisada. Misturaram-se as soluções com a ajuda de uma pipeta. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a solução foi novamente misturada por inversão e procedeu-se à leitura de absorvância a 595 nm. Ao valor de absorvância da amostra foi subtraído o valor do branco (0,1M Tris-HCl, pH 8,0 + NaOH+ reagente de Bradford). Os resultados foram obtidos por extrapolação com uma curva padrão de BSA. Foram realizados duplicados de cada medição.

A curva padrão foi obtida através da mistura de uma 100 µl de uma solução de BSA de concentração conhecida (0,25; 0,5; 1; 1,4 mg/ml) com 3 ml de reagente de Bradford. A solução foi misturada por inversão e em seguida foi medida a absorvância a 595 nm.

3. Transformação de estirpes de *Mesorhizobium* por conjugação triparental

3.1 Escolha das estirpes a transformar

Para verificar o efeito da presença de um gene *acdS* exógeno na nodulação da planta de grão-de-bico foram transformados vários isolados assim como uma estirpe “tipo” de *Mesorhizobium*, com o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4.

Foram estudados os 56 isolados utilizados no método de detecção por PCR sendo escolhidos 6 desses isolados para o processo de transformação.

A caracterização dos isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico provenientes de várias localizações geográficas de Portugal Continental e Madeira foi efectuada pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade de Évora.

As estirpes de *Mesorhizobium* a transformar foram seleccionadas com base em vários parâmetros como: a actividade natural de ACC desaminase, o número de plasmídeos, a tolerância a factores como o pH ácido, temperatura e salinidade e principalmente pela sua eficiência simbiótica (capacidade de promover o crescimento da planta de grão-de-bico).

Escolheram-se os isolados com maior eficiência simbiótica e capacidades de adaptação pois o principal objectivo será a obtenção de estirpes altamente eficientes possíveis de serem utilizadas em ensaios de campo de acordo com as características do solo onde as plantações de grão-de-bico se encontram inseridas.

A presença de genes *acdS* nas estirpes de *Mesorhizobium* não foi tida em consideração uma vez que estes genes poderão estar silenciados, ou, à semelhança do que acontece com *M.loti* MAFF303099, poderão ser expressos apenas em relação simbiótica.

Foram seleccionados para transformação os isolados T-1-Telhado, PMI-1-Portimão, PMI-6 Portimão, S-8-Sintra, S-15-Sintra e BR-28-Bragança assim como a estirpe tipo *Mesorhizobium ciceri* UPM-Ca7 (Nour *et al.*, 1994) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Caracterização de isolados e estirpe tipo de *Mesorhizobium* de grão-de-bico, seleccionados para o processo de transformação.

Estirpe	E.S (%) (a)	Nº plasmídeos (a)	Actividade da ACC desaminase *(b)	Tolerância a pH ácido (=5) (c)	Tolerância a altas temperaturas (37°C) (d)	Tolerância a baixas temperaturas (15°C) (d)	Halotolerância (1,5%) (c)
T-1- Telhado	100	1	Não	+++	+++ (e)	+++ (e)	++
PMI-1-Portimão	80	1	Não	+	+++	++	+
PMI-6-Portimão	81	1	Não	+	+	+	+
S-8-Sintra	83	1	Não	+++	+++ (e)	+++ (e)	++
S-15-Sintra	79	0	Não	+++	+++ (e)	+++ (e)	++
BR-28-Bragança	48	0	Não	+++	++	++	+
<i>Mesorhizobium</i> <i>ciceri</i> UPM-Ca7	100 (c)	1 (c)	Não	+++	+++	+	+

Legenda: +++ muito tolerante; ++ moderadamente tolerante; + pouco tolerante. **E.S-** eficiência simbiótica.

*em condições de vida livre.

Referências bibliográficas:

- (a) - Alexandre *et al.*, 2009
- (b) - este trabalho
- (c) - Brígido, C., resultados não publicados
- (d) - Alexandre, A., resultados não publicados
- (e) - Nascimento, F., resultados não publicados

3.2 Método de conjugação triparental

Para a obtenção de estirpes de *Mesorhizobium* transformadas com o gene *acdS* foi utilizado o método de conjugação triparental (Martinez-Abarca *et al.*, 2000). Neste método é utilizada uma estirpe de *E. coli* MT616 contendo um plasmídeo “helper” que é responsável pela transferência do material genético entre estirpes; uma estirpe de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo que se pretende mobilizar e uma estirpe de *Mesorhizobium* que irá receber o plasmídeo, sofrendo assim transformação. As estirpes utilizadas no processo de transformação assim como as suas condições de crescimento estão referenciadas na **tabela 2**.

Tabela 2-Estirpes utilizadas no processo de transformação por conjugação triparental. Estirpes de *Mesorhizobium* receptoras estão identificadas a “bold”.

Estirpe/ isolado	Plasmídeo	Resistência a antibióticos	Condições de crescimento	Referência
<i>E. coli</i> MT616	pRK600	25 μ g/ml Cloranfenicol	LB, 37°C	Glick, B.
<i>E. coli</i> DH5 α	pRKACC	15 μ g/ml Tetraciclina	LB, 37°C	Glick, B.
<i>E. coli</i> DH5 α	pRK415	15 μ g/ml Tetraciclina	LB, 37°C	Brígido, C.
T-1- Telhado	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
PMI-1 Portimão	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
PMI-6 Portimão	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
S-8 Sintra	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
S-15 Sintra	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
BR-28 Bragança	-	-	TY, 28°C	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium ciceri</i> UPM-Ca7	-	-	TY, 28°C	Nour <i>et al.</i> , 1994

A estirpe de *E. coli* MT616 contendo o plasmídeo helper pRK600 foi crescida durante a noite a 37°C numa placa de LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levedura e 10 g/L NaCl) contendo 25 μ g/ml de cloranfenicol. As estirpes de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pRK415 e o vector de expressão pRKACC (**Figura 8**) foram

crescidas durante a noite a 37°C na respectiva placa de LB contendo 15 µg/ml de tetraciclina.

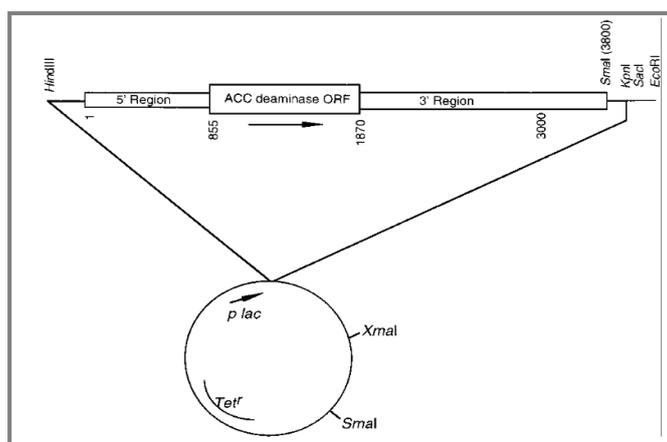


Fig.8- Representação esquemática do plasmídeo pRKACC (adaptado de Shah, *et al.* 1998). O vector de expressão pRKACC é um plasmídeo “low copy”, derivado de pRK415, onde foi clonado um promotor constitutivo do gene de resistência à tetraciclina imediatamente antes da sequência “polylinker” onde foi inserido o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 (3Kb). Este vector confere resistência a 20 µg/ml de tetraciclina em estirpes de *Mesorhizobium*.

A estirpe de *Mesorhizobium* a transformar foi crescida no centro de uma placa de TY (na área de um quadrado de aproximadamente 1,5 cm x 1,5 cm) durante 72 horas a 28°C. Em seguida foram transferidas sequencialmente uma ansada de cada uma das culturas de *E. coli* para a cultura de *Mesorhizobium* que com a ajuda de uma ansa foram misturadas. A mistura foi incubada durante a noite a 28°C.

Após incubação, procedeu-se à suspensão da massa de células da placa em cerca de 3 ml de meio mínimo modificado líquido (6 mg/L FeCl₃.6H₂O; 50 mg/L NaCl; 300 mg/L K₂HPO₄; 300 mg/L KH₂PO₄; 1,1 mg/L ácido glutâmico; 2,5 g/L sacarose; 150mg/L MgSO₄.7H₂O; 50 mg/L CaCl₂.2H₂O; 0.2mg/L d-biotina; 1mg/L tiamina-HCl; 1mg/L pantotenato de cálcio) executando-se em seguida diluições sequenciais (1:10, 1:100 e 1:1000) no mesmo meio. Com o auxílio de esferas foram inoculados 150 µl de cada diluição, em meio mínimo modificado sólido contendo 20 µg/ml de tetraciclina. Estas placas foram incubadas a 28°C durante 4 dias. Procedeu-se então à obtenção de culturas puras através da selecção e repicagem de colónias isoladas em meio mínimo contendo sacarose como única fonte de carbono (a sacarose pode ser metabolizada por *Mesorhizobium*, mas não por *E. coli* DH5α) e com uma concentração de 20 µg/ml de tetraciclina. Foram realizadas 3 repicagens utilizando o método do riscado. Após a

obtenção da cultura pura das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas estas foram transferidas para meio TY contendo 20 µg/ml de tetraciclina.

3.3 Análise qualitativa do processo de transformação

A transformação das estirpes de *Mesorhizobium* foi analisada qualitativamente através da visualização do crescimento das estirpes transformadas em meio TY contendo a pressão selectiva do antibiótico tetraciclina (20 µg/ml), da verificação da existência do plasmídeo (extração do plasmídeo) pRKACC na estirpe transformada e da medição da actividade enzimática da ACC desaminase (descrito no ponto 2).

3.3.1 Extração do plasmídeo pRKACC

A extração do plasmídeo pRKACC a partir das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas foi realizada utilizando o Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Fermentas Life Sciences), segundo as instruções do fabricante.

Após extração, a amostra foi separada por electroforese em gel de agarose 1% (w / v) (Invitrogen) no tampão 0.5 X Tris-borato (TBE) (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3) (Sambrook e Russell, 2001) a 80V durante 1 hora. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Plus (Invitrogen) como referência. O tamanho do plasmídeo pRKACC foi analisado através de uma comparação com o plasmídeo pRK415 obtido pelo mesmo procedimento.

3.4 Análise da taxa de reversão de transformação

A fim de estudar a taxa de reversão das estirpes transformadas ao fénótipo “wild type” foi verificada a capacidade de manutenção do plasmídeo pRKACC, mesmo sem a pressão selectiva do antibiótico. Este parâmetro foi analisado *in vitro* e em estado simbiótico. A análise consiste na comparação entre o número de unidades formadoras de colónias (u.f.c) após crescimento das estirpes transformadas em placas de meio TY com e sem adição de tetraciclina (20 µg/ml). A placa de TY sem antibiótico vai determinar o número total de u.f.c (total de bactérias) e a placa de TY contendo 20 µg/ml de tetraciclina vai determinar o número de u.f.c de bactérias transformadas. A taxa de reversão foi determinada através da relação entre número de bactérias total e número de bactérias transformadas. A taxa de reversão foi analisada durante um período de 120 horas.

3.4.1 Análise da taxa de reversão de transformação- *In vitro*

As estirpes de *Mesorhizobium* transformadas foram crescidas durante a noite em meio líquido TY contendo 20 µg/ml de tetraciclina. No dia seguinte cerca de 200 µl (100 µl +100 µl) de cultura são utilizados para plaqueamento em meio TY com e sem tetraciclina. Da cultura em meio líquido são retirados x µl, dependendo do ajuste da cultura para uma densidade óptica (OD) de 0,1, que vão ser repostos em meio líquido TY sem antibiótico. O ajuste de OD é bastante importante pois garante a mesma quantidade de bactéria em todas as passagens.

Após crescimento durante a noite o processo é novamente repetido, durante 5 passagens (uma passagem de 24 em 24h).

3.4.2 Análise da taxa de reversão de transformação após simbiose.

Após re-isolamento de bactérias a partir de nódulos, foi analisada a taxa de reversão de transformação para verificar se as bactérias transformadas perdiam ou não o plasmídeo pRKACC após estabelecimento da relação simbiótica com o seu hospedeiro específico. O procedimento baseia-se no mesmo princípio da análise *in vitro*. Neste estudo as bactérias são obtidas a partir de nódulos. Cerca de 3 nódulos de cada planta (plantas inoculadas com bactérias transformadas) foram retirados da raiz com o auxílio de uma pinça e esterilizados através de uma embebição em álcool a 70% durante 1 minuto, seguido de embebição em 0,1% bicloreto de mercúrio durante 4 minutos e lavagem final com água esterilizada por 6 vezes. Após esterilização (a fim de remover qualquer contaminação exterior), os nódulos foram colocados num tubo de 1,5 ml contendo 200 µl de meio líquido TY, onde foram esmagados com o auxílio de uma ponta de pipeta estéril, libertando assim as bactérias que estavam dentro do nódulo para o meio líquido. Foram então retirados cerca de 30 µl da cultura em meio líquido para inoculação em placas de MLA (0,675 g/L de K₂HPO₄.3H₂O; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g/L de NaCl; 10 g/L de manitol; 0,5 g/L de extracto de levedura) coradas com vermelho do congo (fenolsulfonaftaleína), com e sem adição de tetraciclina.

4. Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre *Mesorhizobium* e *Cicer arietinum*.

Para verificar o papel da enzima ACC desaminase na nodulação e efectividade simbiótica em condições normais e de stresse por encharcamento, foi delineado um ensaio em plantas em condições gnotobióticas. Este estudo consistiu no crescimento de plantas de grão-de-bico previamente inoculadas com as estirpes T-1 Telhado “wild-type” e T-1 Telhado “transformada”. Esta estirpe foi seleccionada devido à sua alta eficiência simbiótica e elevada tolerância (**Tabela 1**).

Após 3 semanas de crescimento normal, as plantas foram expostas à situação de stresse por encharcamento durante 7 dias consecutivos (Cowie *et al.*, 1996^a).

Para este estudo foram utilizadas sementes de grão-de-bico da variedade ChK3226 (cortesia da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas, Elvas). Estas foram previamente desinfectadas por submersão numa solução de hipoclorito de cálcio a 14% durante 45 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas por 6 vezes com água destilada estéril e foram deixadas em embebição na água da última lavagem a 28°C durante 2 horas. Após lavagem, as sementes foram distribuídas em placas de 0,75% Agar de água com a ajuda de pinças esterilizadas. As sementes foram então incubadas numa estufa, na ausência de luz, a 28°C durante cerca de 48 horas para a sua germinação.

Após germinação, foi inserida uma radícula por cada vaso de plástico (11 cm diâmetro) previamente esterilizado contendo cerca de 100 g de vermiculite (granulometria 2,3) também esterilizada. As radículas foram inseridas no vaso a cerca de 1 cm de profundidade. Em seguida foi aplicado um inóculo de cerca de 2 ml (10^9 células ml^{-1}) de cada bactéria (estirpe T-1-Telhado “wild-type” e estirpe T-1-Telhado transformada com pRKACC, conforme o tratamento). Tapou-se a semente com o auxílio de pinças estéreis e aplicaram-se 100 ml de solução nutritiva sem fonte de azoto (Broughton e Dilworth, 1971). Em seguida tapou-se o vaso com folha de alumínio, que assim foi levado para a câmara de crescimento de plantas (Walkin-fitoclima, Aralab). Todos estes procedimentos foram realizados em ambiente estéril e de total assépsia.

A câmara de crescimento de plantas foi programada com as seguintes condições:

-65% Humidade

-Fotoperíodo de 16 horas constituído por um ciclo diurno (a 22°C durante 60 min, 24°C durante 840 min e 20°C durante 60 min) e um ciclo nocturno (a 20°C durante 60 min, 18°C durante 360 min e 22°C durante 60 min).

As plantas foram regadas de 2 em 2 dias com cerca de 100 ml de uma solução nutritiva sem fonte de azoto descrita por Broughton e Dilworth (1971).

Ao fim de 17 dias após remoção do stresse (45 dias após inoculação), foram retiradas e analisadas 9 plantas de cada tratamento sendo avaliados diversos parâmetros.

Na tentativa de conhecer os efeitos do stresse e da transformação ao longo do processo de nodulação foi também realizado um estudo temporal, em que foram analisadas 4 plantas de cada tratamento retiradas ao fim de 3, 10 e 17 dias após remoção do stresse (31, 38 e 45 dias após inoculação (DAI) respectivamente).

Ambos os ensaios foram delineados através do método de blocos casualizados.

Em cada momento de colheita as plantas foram tratadas para posterior avaliação dos diversos parâmetros a estudar. A raíz foi separada do caule, lavada e posteriormente utilizada para o ensaio da medição da actividade do complexo enzimático nitrogenase e posterior contagem de nódulos. Após estas avaliações, todo o material biológico foi seco a 70°C, até atingir um peso constante, para posterior avaliação dos respectivos pesos secos (parte aérea, raíz e nódulos).

Neste estudo foram avaliados os parâmetros: Biomassa total (peso seco da parte aérea + peso seco da raíz), peso seco dos nódulos, número médio de nódulos formados e actividade do complexo enzimático nitrogenase.

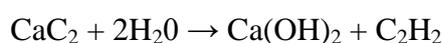
4.1 Medição da actividade do complexo enzimático nitrogenase por cromatografia gasosa

A fim de verificar a influência da enzima ACC desaminase na “possível” fixação de azoto foi medida a actividade do complexo enzimático nitrogenase nos diversos tratamentos.

Este método de quantificação, descrito por Dilworth em 1966, baseia-se na capacidade da redução de acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) por parte do complexo enzimático nitrogenase, constituindo uma medida indirecta da capacidade fixadora de N_2 . A quantidade de acetileno reduzido a etileno é medida por cromatografia gasosa e é comparada com um padrão de concentrações de etileno conhecidas (Somasegaren e Hoben, 1994; Ma *et al.*, 2003^a).

4.1.1 Obtenção de acetileno

O acetileno foi obtido através da reacção de carbeto de cálcio (CaC_2) com água:



Foram feitas reagir cerca de 15 g de carbeto de cálcio com cerca de 500 ml de água, capturando-se em seguida o gás acetileno em frascos de 25 ml (**Figura 9**).

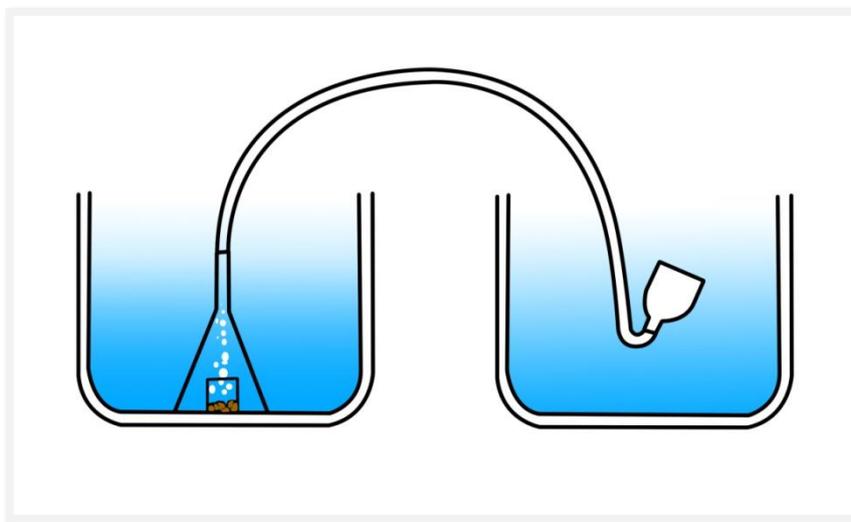


Fig.9- Esquema representativo do método de obtenção de acetileno pela prática corrente no Laboratório de Microbiologia do solo da Universidade de Évora.

4.1.2 Tratamento da raíz

Após a separação da raíz do caule, esta foi imediatamente colocada num frasco de 25 ml. O frasco foi bem rolhado para não permitir a saída ou entrada de qualquer gás contaminante.

Foram então retirados cerca de 2 ml de ar do frasco com uma seringa de 2,5 ml e injectados 2 ml de acetileno, criando assim uma atmosfera com cerca de 10% de

acetileno (condição óptima para a redução de acetileno a etileno) (Somasegaren e Hoben, 1994).

Após introdução do acetileno, os frascos foram incubados numa estufa a 28°C durante 1 hora a fim de ocorrer a reacção enzimática.

4.1.3 Quantificação por cromatografia gasosa

Foram retirados do frasco cerca de 250 µl de gás com uma microseringa, e este foi inserido no cromatógrafo HP 5710A (Hewlett-Packard, Califórnia) de detecção de ionização de chama a hidrogénio, equipado com uma coluna Porapak N de malha 100-200 utilizando N₂ como gás de arraste. O ar e o hidrogénio são transportados com uma taxa de 300 e 90 ml/min respectivamente e o gás de arraste com uma taxa de 50 ml/min. Estas condições permitem uma boa separação de etileno e acetileno (Somasegaren e Hoben, 1994).

Foi obtida uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de etileno. Os resultados foram extrapolados através da comparação com a curva padrão e expressos em µmol de etileno/ mg de nódulo/ h.

4.2 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos no ensaio de crescimento de plantas foi realizada utilizando análises ANOVA no programa SPSS Statistics v.17 (SPSS Inc., IBM Company).

Resultados e Discussão

1. Detecção do gene *acdS* em isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico através do método de PCR

O gene *acdS* foi detectado, pelo método de PCR, em 11 dos 56 isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico estudados neste trabalho (**Figura 10**).

O tamanho do fragmento obtido corresponde ao esperado (≈ 810 pares de bases).

Após análise da sequência nucleotídica do produto amplificado, verificou-se que os genes *acdS* detectados apresentam 100% de identidade com o gene *acdS* de *M. loti* MAFF303099 (resultados não apresentados).

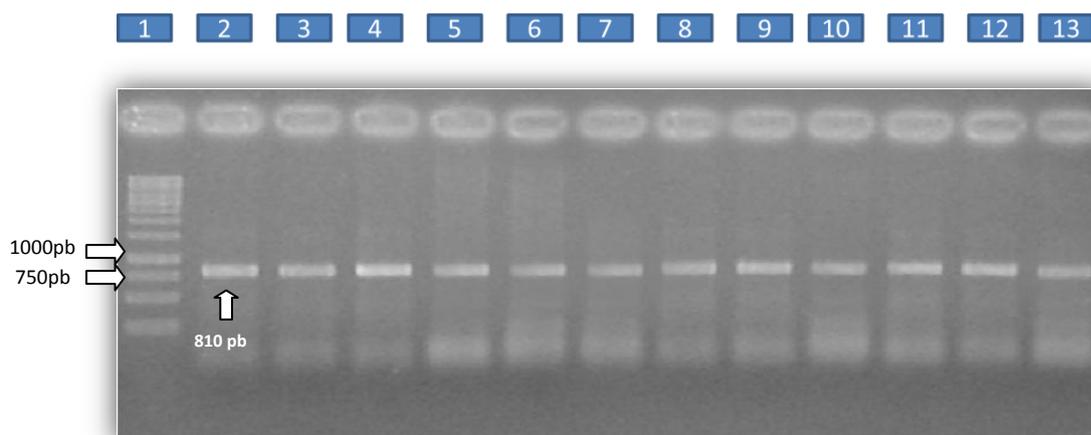


Fig.10- Detecção do gene *acdS*, pelo método de PCR, em 11 dos isolados estudados neste trabalho. Setas indicam o tamanho do fragmento em pares de bases.

1-“Gene Ruler 1 kb DNA ladder”; 2- *Mesorhizobium loti* MAFF 303099; 3- CR-18-Caldas da Rainha; 4- CB-38-Castelo Branco; 5- CB-10-Castelo Branco; 6- STR-10-Santarém; 7- STR-4-Santarém; 8- 102-Évora; 9- 94-Évora; 10- 90-Évora; 11- AL-13-Alenquer; 12- C-13-Coimbra; 13- C-23-Coimbra.

O gene *acdS* é detectado pelo método de PCR nos isolados utilizados neste estudo com uma frequência de cerca de 19,6 %. Este resultado difere dos resultados obtidos nos estudos de prevalência do gene *acdS* em estirpes de rizóbio efectuados por Ma *et al.*, (2003b) e Duan *et al.*, (2008). No estudo efectuado por Ma *et al.*, (2003b) verificou-se que 5 em 13 (cerca de 38,5%) estirpes de rizóbio possuíam o gene *acdS*. Duan *et al.*, (2008) observou que 27 em 233 (cerca de 11%) estirpes de rizóbio provenientes de Saskatchewan (Canadá) possuíam o gene *acdS*. Através destes resultados observa-se que com o aumento do número de isolados estudados, ocorre uma

diminuição da frequência da detecção do gene *acdS*. Porém, é de notar a elevada dispersão deste gene em populações de rizóbio. Este facto vem demonstrar que a expressão da enzima ACC desaminase poderá ser realmente benéfica e de algum modo trazer vantagens à estirpe produtora.

Através do método de PCR, não foi detectada a presença do gene *acdS* nas 6 estirpes “tipo” de *Mesorhizobium* estudadas neste trabalho, assim como também não foi obtida qualquer amplificação do gene *acdS* nos isolados de *Mesorhizobium* posteriormente utilizadas no processo de transformação, mesmo utilizando os “primers” específicos para amplificar o único gene *acdS* conhecido em bactérias do género *Mesorhizobium* (gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099).

2. Análise Filogenética do gene *acdS*

Após análise da sequência nucleotídica dos genes *acdS* detectados nos 11 isolados de *Mesorhizobium*, foi gerada uma árvore demonstrando as relações filogenéticas entre diversas estirpes bacterianas possuidoras do gene *acdS* (**Figura 11**). Pela visualização da árvore filogenética, é possível confirmar que todos os genes *acdS* detectados nas estirpes nativas de *Mesorhizobium* são idênticos ao gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. Porém, apesar de possuírem um gene *acdS* semelhante verifica-se que os 11 isolados não pertencem à mesma espécie (**Figura 12**).

Estes resultados vêm mais uma vez corroborar a hipótese descrita por Boucher *et al.*, (2003) que propõe que alguns genes podem ser adquiridos por transferência horizontal. Se o gene *acdS* fosse transmitido apenas verticalmente (à descendência) então seria de esperar que os 11 isolados de *Mesorhizobium* pertencessem à mesma espécie, contudo, como se pode visualizar através da árvore filogenética baseado na sequência nucleotídica do 16S rDNA, tal não se verifica. Provavelmente muitas das estirpes de *Mesorhizobium* adquiriram o gene *acdS* através de transferência horizontal de genes.

Este é o primeiro registo da presença do gene *acdS* em isolados das espécies *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium amorphae* e *Mesorhizobium huakui*.

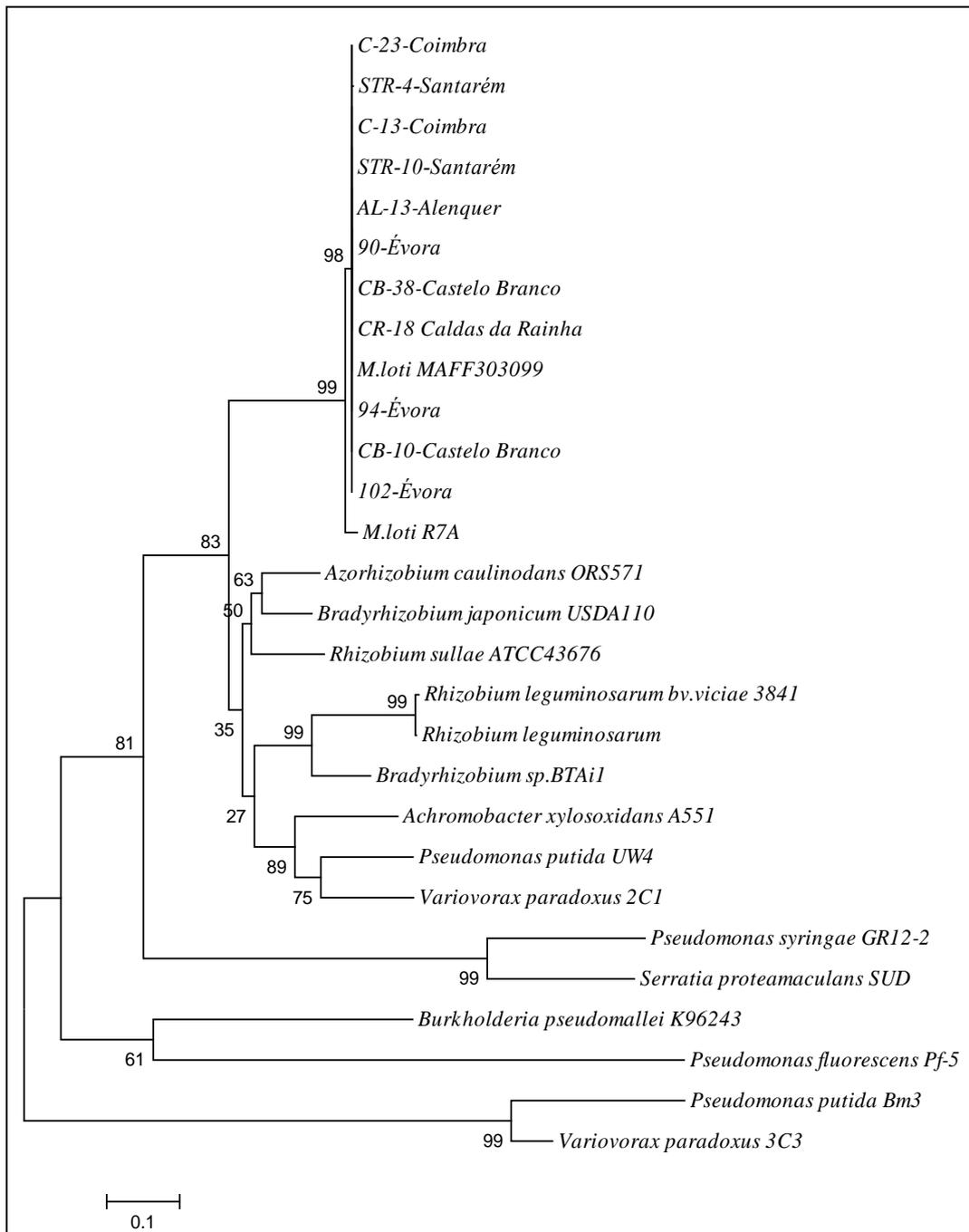


Fig.11- Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (600 pb) do gene *acdS* mostrando as relações entre isolados onde foi detectado o gene *acdS* e várias estirpes bacterianas. A análise foi efectuada pelo método de “neighbor-joining” utilizando o modelo de dois parâmetros de Kimura (1980) e um valor de “bootstrap” de 1000 repetições. Os números de acesso das sequências nucleotídicas são apresentados em anexo (anexo 3).

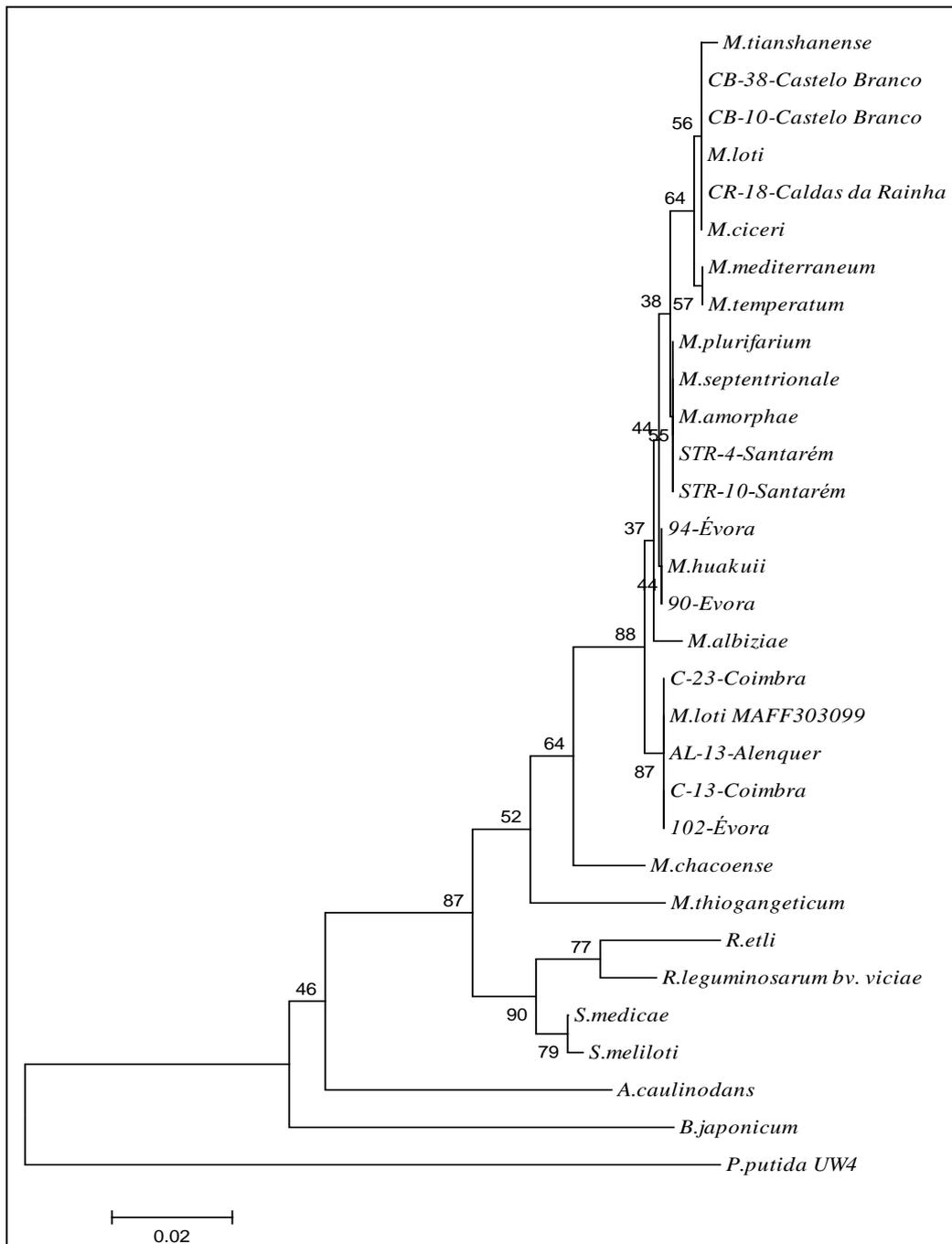


Fig.12- Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (617 pb) do 16S rDNA mostrando as relações entre isolados onde foi detectado o gene *acdS* e várias estirpes de rizóbio. A análise foi efectuada pelo método de “neighbor-joining” utilizando o modelo de dois parâmetros de Kimura (1980) e um valor de “bootstrap” de 1000 repetições. Os números de acesso das sequências nucleotídicas são apresentados em anexo (anexo 4).

Os números de acesso para os isolados estudados encontram-se nas respectivas referências (anexo 1), quando aplicável.

3. Medição da actividade da ACC desaminase nos isolados possuídores do gene *acdS*

A actividade enzimática de ACC desaminase foi medida nos isolados de *Mesorhizobium* onde foi detectada a presença do gene *acdS*. Não foi observada qualquer actividade enzimática da ACC desaminase nas estirpes testadas (CB-10-Castelo branco; CB-38-Castelo Branco; STR-4-Santarém; STR-10-Santarém; AL-13-Alenquer; 90-Évora). Este resultado está de acordo com o esperado, pois os genes *acdS* detectados nos isolados de *Mesorhizobium* são semelhantes ao gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 e esta não apresenta qualquer actividade da enzima ACC desaminase em condições de vida livre (Ma *et al.*, 2003^a).

Nem todos os isolados possuídores do gene *acdS* foram testados, uma vez que é bastante provável que estes não possuam actividade da enzima ACC desaminase em condições de vida livre. Se todos os genes detectados nos isolados são iguais ao de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 então provavelmente nenhum produz a enzima ACC desaminase em condições de vida livre.

A quantidade de proteína total não foi quantificada, visto que os isolados testados não demonstraram qualquer produção de α -cetobutirato através da degradação do ACC.

4. Análise do número de cópias do gene *acdS*

Nos 11 isolados de *Mesorhizobium* (onde o gene *acdS* foi detectado) apenas existe uma cópia do gene *acdS*. Após digestão com *Bam*HI e consequente electroforese o gene *acdS* é detectado pelo método de hibridação de Southern, verificando-se então que este se encontra num fragmento com cerca de 6 Kb (**Figura 13**). Este resultado é semelhante ao obtido por Ma *et al.*, (2003^b) na estirpe *M.loti* MAFF303099.

O resultado obtido está de acordo com o esperado, visto que os genes *acdS* dos isolados de *Mesorhizobium* são semelhantes ao gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099. Contudo, é de notar que isolados pertencentes a diferentes espécies de *Mesorhizobium* possuem o gene *acdS* num fragmento exactamente do mesmo tamanho. Este resultado sugere que não só o gene *acdS* poderá ter sido transferido horizontalmente como também a região onde este se encontra inserido.

O método de Southern foi também utilizado para uma detecção do gene *acdS* nas estirpes escolhidas para transformação. Pelo método de PCR não foram detectados quaisquer genes *acdS* nestas estirpes. No entanto, através do método de hibridação de Southern foram detectados genes *acdS* em 6 das estirpes escolhidas para o processo de transformação (**Figura 14**).

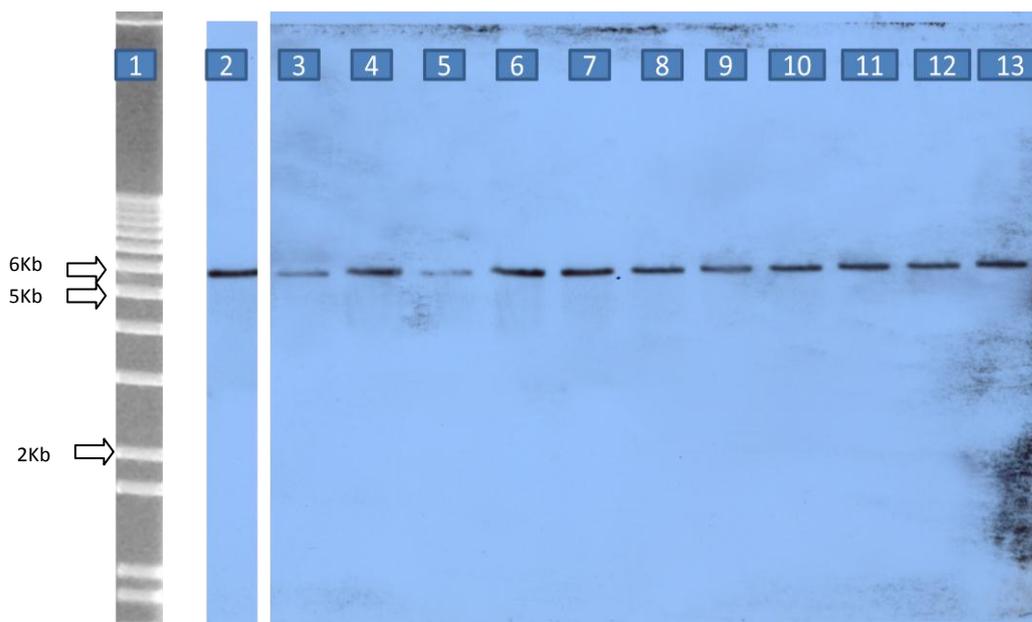


Fig.13- Número de cópias do gene *acdS* detectadas pelo método de hibridação de Southern, nos 11 isolados possuidores do gene *acdS*. Setas indicam o tamanho do fragmento em kilobases.

1-“DNA Ladder 1kb Plus”; 2- *M.loti* MAFF303099; 3- CR-18- Caldas da Rainha; 4- CB-38- Castelo Branco; 5- CB-10- Castelo Branco; 6- STR-10- Santarém; 7- STR-4- Santarém; 8-102- Évora; 9- 94- Évora; 10- 90-Évora; 11- AL-13- Alenquer; 12- C-13-Coimbra; 13- C-23- Coimbra.

O gene *acdS* obtido nestas estirpes encontra-se num fragmento com cerca de 7,5 Kb, ao contrário do gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099 que se encontra num fragmento com cerca de 6 Kb. Todavia, este novo gene *acdS* deverá ser bastante semelhante ao gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099 visto que se obtém um sinal bastante visível e forte (correspondendo a uma forte hibridação)

Este resultado vem contrariar os resultados obtidos por Ma *et al.*, (2003^b), nos quais não foi detectada a presença do gene *acdS* na estirpe tipo *Mesorhizobium ciceri* UPM Ca-7. Uma das possíveis causas para esta discrepância entre resultados poderá residir na sonda utilizada e condições do método de hibridação de Southern. No estudo

efectuado por Ma *et al.*, (2003^b) foi utilizada uma sonda baseada no gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4. Neste trabalho foi utilizada uma sonda baseada no gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. A região do gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 utilizada como sonda poderá ser bastante diferente deste novo gene *acdS*, limitando a hibridação entre ambos. A sonda com base no gene *acdS* de *M. loti* MAFF303099, por sua vez, poderá ser bastante semelhante ao novo gene *acdS* possibilitando assim a sua detecção.

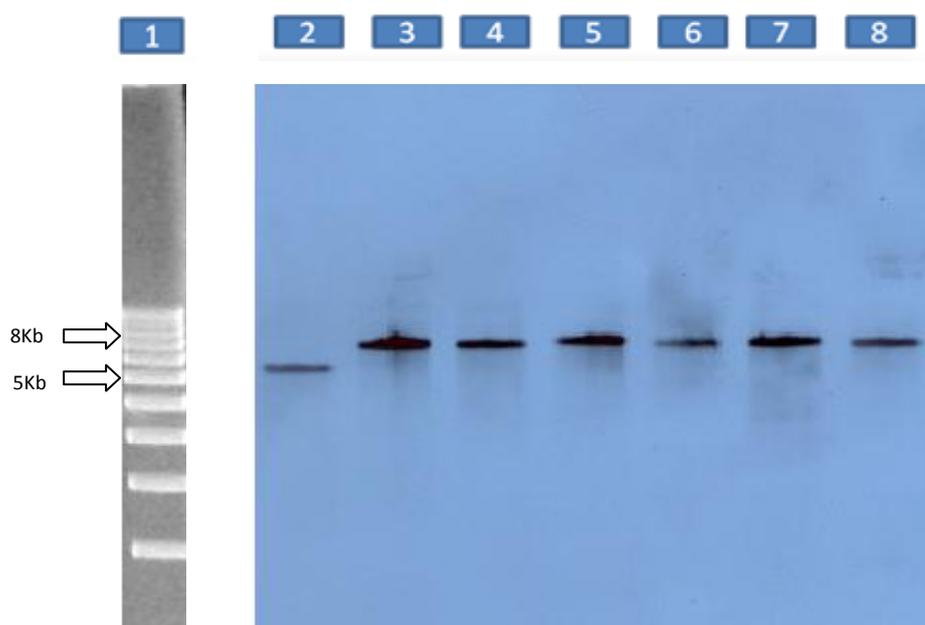


Fig. 14- Detecção do gene *acdS* pelo método de hibridação de Southern em 6 das estirpes escolhidas para o processo de transformação. Setas indicam o tamanho do fragmento em kilobases.

1-“DNA Ladder 1kb Plus”; 2- *M. loti* MAFF303099 3- T-1 Telhado; 4- PMI-1-Portimão; 5- S-8-Sintra; 6- S-15-Sintra; 7- *Mesorhizobium ciceri*; 8- PMI-6-Portimão

*Todas as estirpes escolhidas para transformação foram estudadas, excepto o isolado BR-28-Bragança do qual não foi possível obter DNA em quantidade suficiente para a aplicação no método de hibridação de Southern.

Com base nestes novos resultados, procedeu-se à detecção do gene *acdS* nas estirpes *Pseudomonas putida* UW4 e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K utilizando a sonda baseada no gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (**Figura 15**). Além destas estirpes foram também utilizadas 3 estirpes tipo de *Mesorhizobium* a fim de verificar a presença do gene *acdS*.

Através da visualização da **figura 15**, verifica-se que utilizando a sonda baseada no gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099 não é possível detectar qualquer gene *acdS* em *Pseudomonas putida* UW4 e *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 128C53K.

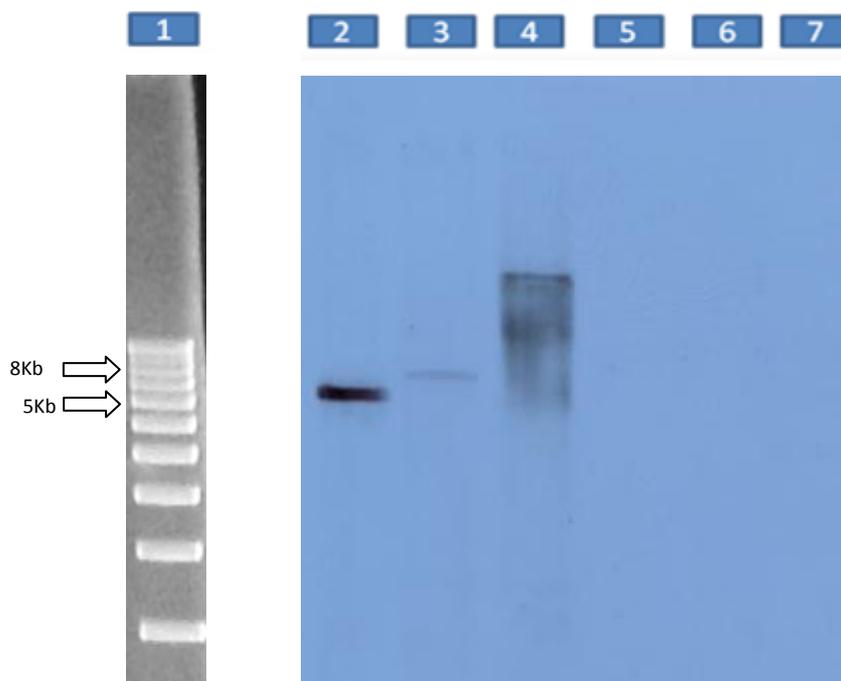


Fig.15- Detecção do gene *acdS* em estipes “tipo” de *Mesorhizobium* através do método de hibridação de Southern. Setas indicam o tamanho do fragmento em kilobases.

1-“DNA Ladder 1kb Plus”; 2- *Mesorhizobium loti* MAFF303099 3- *Mesorhizobium amorphae*; 4- *Mesorhizobium mediterraneum*; 5- *Mesorhizobium huakui*; 6- *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 128C53K; 7- *Pseudomonas putida* UW4.

Este resultado poderá ser explicado pelas condições de hibridação, que poderão ter sido demasiado restritas, permitindo apenas a hibridação de sequências altamente similares. Para conseguir detectar outros genes *acdS*, deveria ser utilizada uma menor temperatura de hibridação assim como temperaturas de restringência inferiores, permitindo então a hibridação entre sequências com menor homologia.

Este resultado vem também confirmar a alta similaridade do gene *acdS* detectado nas estirpes escolhidas para transformação, com o gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099.

Na **figura 15** é possível também verificar a presença do gene *acdS* nas estirpes tipo *Mesorhizobium amorphae* e *Mesorhizobium mediterraneum*. *Mesorhizobium huakui* não possui qualquer gene *acdS* detectável.

Em *Mesorhizobium amorphae* o gene *acdS* é detectado num fragmento com cerca de 7,5 Kb (resultado semelhante ao da estirpe *Mesorhizobium ciceri*). Contudo, em *Mesorhizobium mediterraneum* é bastante difícil definir o tamanho do fragmento onde o gene *acdS* está inserido. Nesta última poderá ter ocorrido uma digestão incompleta do DNA não permitindo uma boa visualização do fragmento.

A detecção do gene *acdS* pelo método de hibridação de Southern nas estirpes seleccionadas para transformação e em diversas estirpes tipo, veio demonstrar a ineficácia do método de PCR como método de detecção. No método de PCR são utilizados “primers” que são “construídos” para amplificar sequências bastante específicas. Contudo, as sequências do gene *acdS* podem variar bastante entre diferentes organismos e estirpes (Glick, 2007). Havendo diferenças entre as sequências do gene *acdS* torna-se bastante difícil a sua amplificação por PCR.

Através da utilização do método de Southern foi possível detectar o gene *acdS* em 8 de 9 estirpes estudadas (88,9%). Passam a ser 16 os isolados de *Mesorhizobium* possuidores do gene *acdS*, assim como 3 estirpes tipo. Porém, muitos mais isolados poderão possuir o gene *acdS* tornando-se necessária uma nova abordagem na detecção do gene *acdS* nas estirpes de *Mesorhizobium*.

Este resultado demonstra a elevada frequência do gene *acdS* em populações de *Mesorhizobium*, e a existência de pelo menos dois conjuntos de genes *acdS* dispersos pela população (o gene *acdS* de *M. loti* MAFF303099 e o gene *acdS* de *M. ciceri*). Estes dois genes apresentam uma elevada similaridade, no entanto, será necessário o conhecimento da sequência do gene *acdS* de *M. ciceri* para permitir uma análise mais conclusiva. Foram feitos esforços para a obtenção da sequência dos genes *acdS* dos isolados seleccionados para transformação incluindo a estirpe tipo *Mesorhizobium ciceri*, contudo, devido à limitação temporal deste trabalho tal não foi possível.

Com base nos resultados obtidos na medição da actividade enzimática da ACC desaminase, é provável que o gene *acdS* encontrado nas estirpes utilizadas no processo de transformação esteja sobre regulação de genes simbióticos, como o que acontece

com o gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099. Estas estirpes não apresentaram qualquer actividade da enzima ACC desaminase em condições de vida livre, no entanto, poderão expressar a enzima em condições de simbiose, dentro dos nódulos, como demonstrado em *M.loti* MAFF303099 (Uchiumi *et al.*, 2004).

Devido a diversos factores entre eles a limitação temporal deste trabalho, não foi possível a utilização do método de hibridação de Southern para a detecção do gene *acdS* nos 56 isolados utilizados anteriormente no método de detecção por PCR.

5. Análise qualitativa do processo de transformação por conjugação triparental

5.1 Análise do crescimento em placa e em meio líquido

A eficácia da transformação das estirpes de *Mesorhizobium* escolhidas foi verificada pela análise qualitativa do crescimento da estirpe em meio sólido (meio mínimo e TY) e em meio líquido (TY), com base na selecção por resistência à tetraciclina conferida pelo plasmídeo pRKACC. A estirpe “wild type” não apresenta resistência ao antibiótico, sendo incapaz de crescer em meios onde tetraciclina esteja presente.

Na **figura 16** pode-se verificar que a transformação das estirpes de *Mesorhizobium* por conjugação triparental ocorreu com sucesso. Ao contrário das estirpes transformadas, as estirpes “wild type” não apresentam qualquer crescimento em meio contendo tetraciclina (20 µg/ml). Este resultado indica que a assimilação e retenção do plasmídeo pRKACC (que confere resistência à tetraciclina) por parte das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas foi bem sucedida e veio permitir a replicação bacteriana em meios onde anteriormente estas não seriam capazes de se desenvolver. Ao garantir o crescimento em meio com tetraciclina garante-se a presença do plasmídeo pRKACC e conseqüentemente a presença do gene *acdS* codificando a enzima ACC desaminase. Todas as estirpes foram transformadas com sucesso (resultados não apresentados).

Até à data não existem quaisquer outros registos bibliográficos da transformação por conjugação triparental de estirpes de *Mesorhizobium*, sendo que este trabalho

poderá permitir uma nova abordagem para a transformação destas estirpes economicamente importantes.

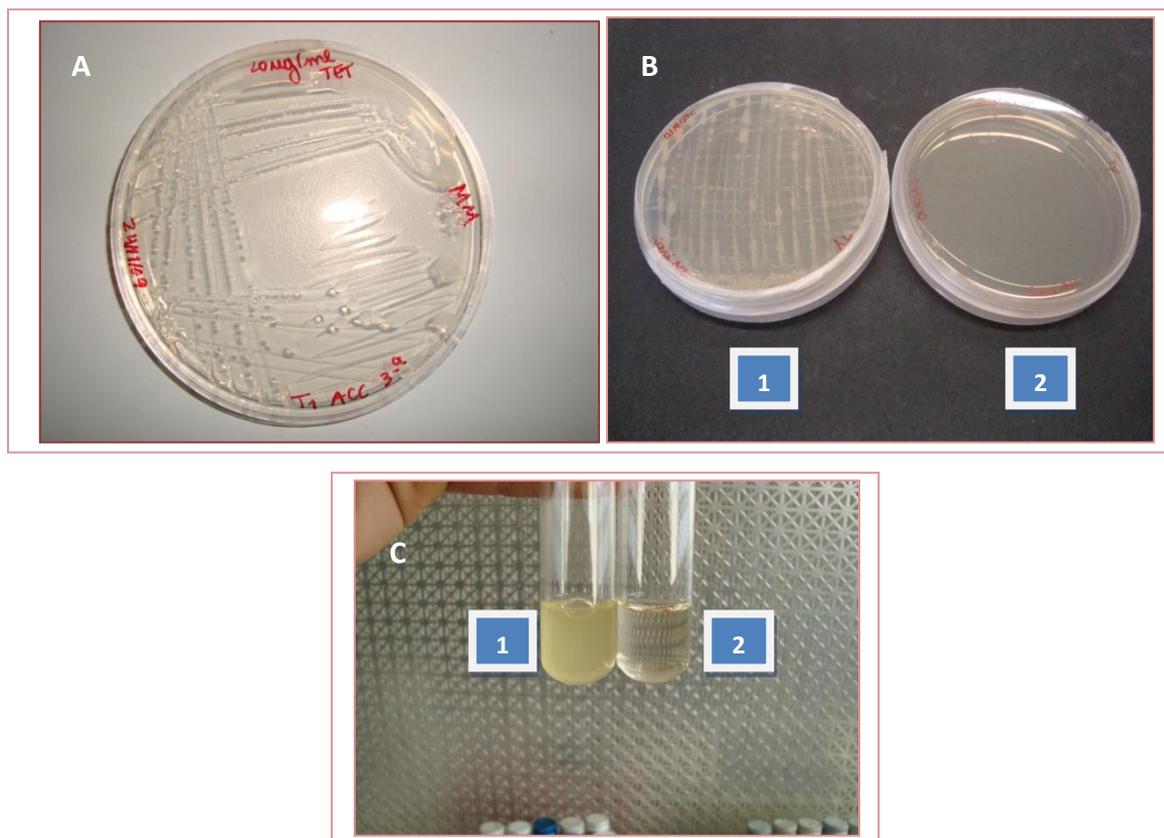


Fig. 16- Análise da transformação de estirpes de *Mesorhizobium* por conjugação triparental- Análise do crescimento em placa e em meio líquido.

- A-** 3ª Repicagem e isolamento da estirpe T-1-Telhado transformada com pRKACC, em placa de meio mínimo contendo 20 µg/ml de tetraciclina.
- B-** 1- Crescimento da estirpe *Mesorhizobium ciceri* transformada com pRKACC, em placa de TY contendo 20 µg/ ml de tetraciclina.
2- Crescimento da estirpe *Mesorhizobium ciceri* “wild type” em placa de TY contendo 20 µg/ ml de tetraciclina.
- C-** 1- Crescimento da estirpe T-1-Telhado transformada com pRK ACC, em meio líquido TY contendo 20 µg/ ml de tetraciclina.
2- Crescimento da estirpe T-1-Telhado “wild type” em meio líquido TY contendo 20 µg/ ml de tetraciclina.

5.2 Extração do plasmídeo

Através da análise qualitativa realizada pela comparação relativa do tamanho do fragmento obtido com o tamanho do plasmídeo pRK415, é possível confirmar a presença do plasmídeo pRKACC em 5 das estirpes transformadas. A **figura 17** mostra

um fragmento acima dos 12 Kb (12000 pb), como era esperado, e mostra claramente a diferença entre o plasmídeo pRK415 e o plasmídeo pRKACC (uma diferença de 3Kb- o tamanho do gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4).

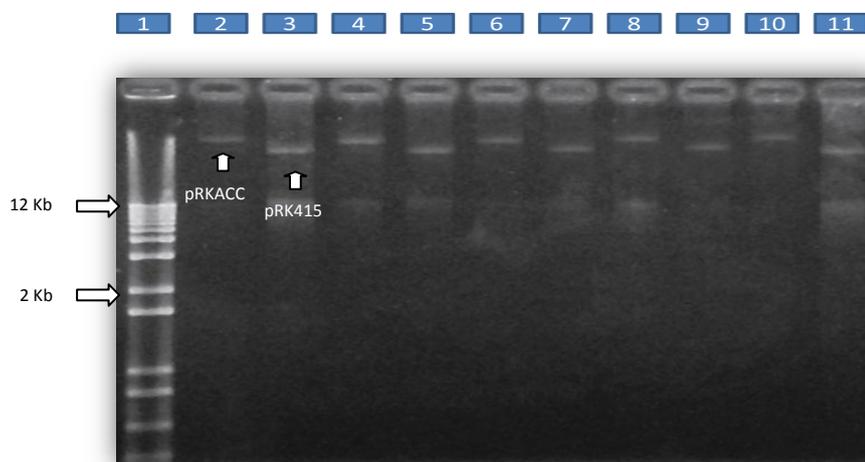


Fig.17- Gel de agarose contendo os produtos da extração de plasmídeos. 1-“DNA Ladder 1kb Plus”; 2- T-1 Telhado pRKACC; 3- T-1-Telhado pRK415; 4-*Mesorhizobium ciceri* pRKACC; 5-*Mesorhizobium ciceri* pRK415; 6- PMI-1-Portimão pRKACC; 7- PMI-1-Portimão pRK415; 8- S-8-Sintra pRKACC; 9- S-8-Sintra pRK415; 10- S-15-Sintra pRKACC; 11- S-15-Sintra pRK415.

Porém, o tamanho dos plasmídeos no gel poderá não corresponder ao seu tamanho real, visto que por vezes os plasmídeos poderão assumir uma forma “supercoiled” (enrolada) e não linear que migra de forma diferente no gel de agarose. Para garantir a forma linear do plasmídeo, este deveria ser linearizado com uma enzima de restrição com apenas um local de corte conhecido no plasmídeo pRK415 e pRKACC.

Nas estirpes BR-28 Bragança e PMI-6 Portimão não foi possível a extração do plasmídeo pRKACC. Isto dever-se-á ao facto de não ter havido uma quantidade de células suficientes que permitisse uma extração de plasmídeo em quantidades possíveis de serem visualizadas em gel de agarose.

Para uma melhor análise dos fragmentos obtidos seria necessária uma maior quantidade de plasmídeo extraído, a consequente linearização do mesmo através do uso de enzimas de restrição e um marcador de peso molecular que atingisse valores acima dos 14 Kb (tamanho do plasmídeo pRKACC).

5.3 Medição da actividade enzimática da ACC desaminase

Pode-se afirmar que a transformação das estirpes de *Mesorhizobium* seleccionadas foi bem sucedida. Estirpes que antes não possuíam qualquer actividade da enzima ACC desaminase em condições de vida livre passaram a expressar a enzima em relativa abundância (**Tabela 3**). Este facto comprova a presença e consequente utilização do plasmídeo pRKACC por parte das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas.

Tabela 3- Valores da actividade enzimática da ACC desaminase nas estirpes de *Mesorhizobium* “wild type” e transformadas. Medições efectuadas em duplicado. (n.d- não determinado).

Estirpe	α -cetobutirato (μ mol)	Proteína total (mg/ml)	Tempo de incubação (horas)	μ mol α -cetobutirato/mg proteína/hora
<i>M.ciceri</i> pRKACC	3,8714	2,3481	0,5	3,298
S-15-Sintra pRKACC	2,0149	2,2551	0,5	1,787
S-8-Sintra pRKACC	1,4698	1,9184	0,5	1,532
BR-28-Bragança pRKACC	0,9265	1,7392	0,5	1,065
T-1-Telhado pRKACC	1,9086	1,8968	0,5	2,012
PMI-1-Portimão pRKACC	1,1999	1,9331	0,5	1,241
PMI-6-Portimão pRKACC	n.d	n.d	-	n.d
<i>M.ciceri</i>	0	n.d	0,5	0
S-15-Sintra	0	n.d	0,5	0
S-8-Sintra	0	n.d	0,5	0
BR-28-Bragança	0	n.d	0,5	0
T-1-Telhado	0	2,0834	0,5	0
PMI-1-Portimão	0	n.d	0,5	0
PMI-6-Portimão	0	2,0624	0,5	0

Em algumas estirpes não foi medida a quantidade de proteína total, visto que estas não demonstraram qualquer produção de α -cetobutirato.

Apesar das estirpes de *Mesorhizobium* terem sido transformadas com o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4, não se observa um valor de actividade enzimática semelhante ao de *Pseudomonas putida* UW4 (cerca de 21,23 $\mu\text{mol } \alpha\text{-cetobutirato/mg}$ proteína/hora) (Ma *et al.*, 2003^b) (**Gráfico 1**).

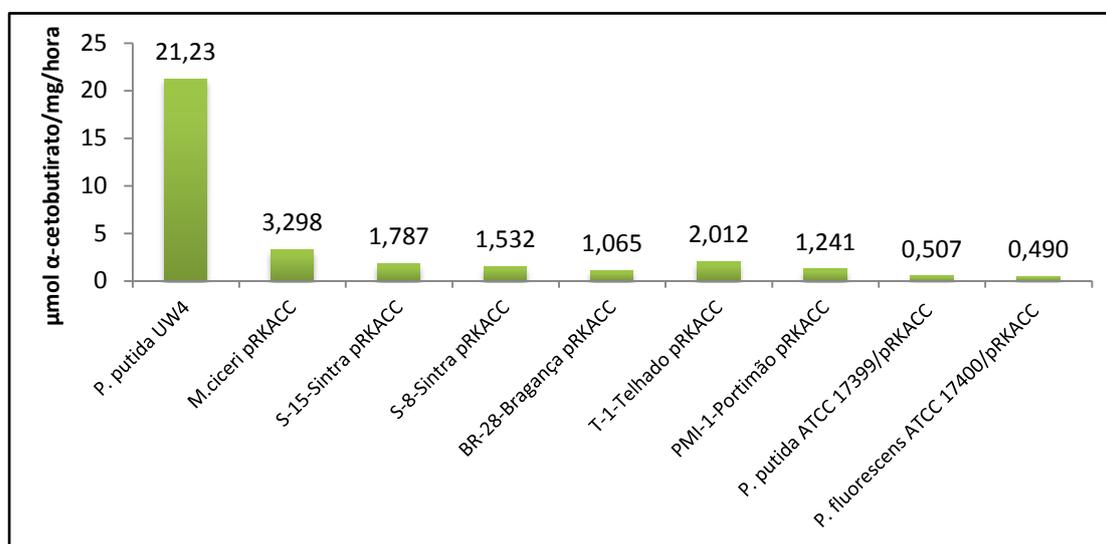


Gráfico 1- Comparação da actividade enzimática da ACC desaminase entre as estirpes de *Mesorhizobium* transformadas, *P.putida* UW4 (Ma *et al.*, 2003^b), *P.putida* ATCC 17399 pRKACC e *P.fluorescens* ATCC 17400 pRKACC (Shah, *et al.*, 1998).

Esta diferença poderá ser explicada pelo simples facto de *P.putida* UW4 possuir o gene *acdS* inserido no seu genoma, ao contrário das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas que possuem o gene *acdS* inserido no plasmídeo “low copy” pRKACC. Ao ser um plasmídeo “low copy”, pRKACC vai estar presente em pouca quantidade nas células, levando a uma expressão limitada de ACC desaminase. Ao replicar o plasmídeo pRKACC, as estirpes de *Mesorhizobium* transformadas vão ter também um maior dispêndio de energia, podendo este limitar de algum modo o normal funcionamento celular e a consequente produção de ACC desaminase.

Existe também uma diferença na actividade enzimática da ACC desaminase entre estirpes transformadas. Todas as estirpes transformadas pertencem ao género *Mesorhizobium*, porém, algumas estirpes pertencem a espécies diferentes (**Figura 18**).

Parâmetros como o tempo de geração bacteriano, número de plasmídeos, eficiência de replicação do plasmídeo pRKACC, frequência de utilização de codões, necessidades energéticas e níveis de expressão de genes podem variar entre espécies

bacterianas, podendo estes contribuir na diferença da actividade enzimática encontrada entre estirpes transformadas.

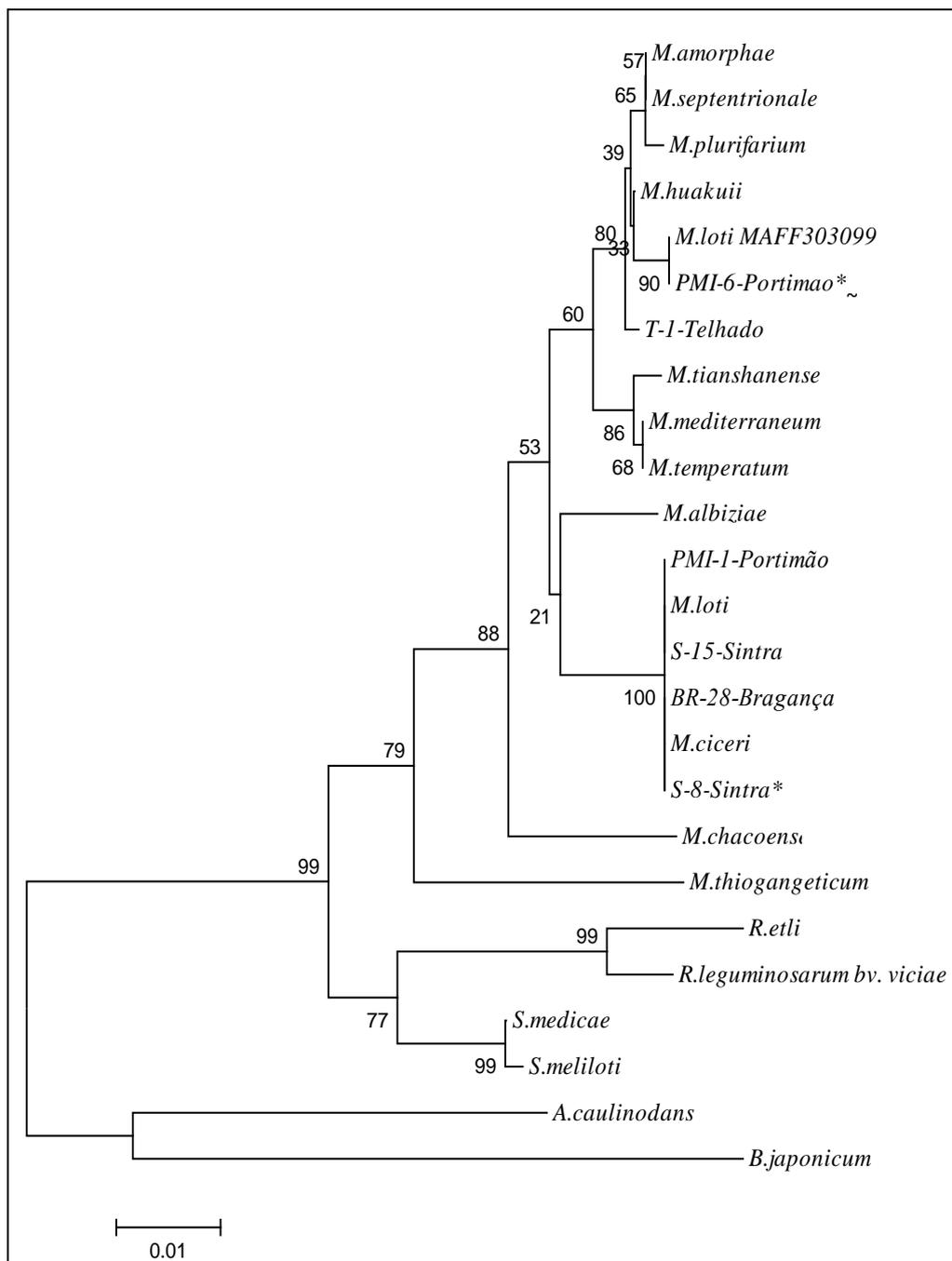


Fig.18- Árvore filogenética com base na sequência nucleotídica parcial (617 pb) do 16S rDNA mostrando as relações entre isolados escolhidos para transformação e estirpes tipo de *Mesorhizobium*. A análise foi efectuada pelo método de “neighbor-joining” utilizando o modelo de dois parâmetros de Kimura (1980) e um valor de “bootstrap” de 1000 repetições. Números de acesso das sequências nucleotídicas, apresentadas em anexo (anexo 4). Os números de acesso para os isolados estudados encontram-se nas respectivas referências (anexo 1), quando aplicável.

Contudo, quando comparadas com as estirpes *P.putida* ATCC 17399 pRKACC e *P.fluorescens* ATCC 17400 pRK ACC (Shah, *et al.*, 1998), as estirpes de *Mesorhizobium* transformadas apresentam valores de actividade da ACC desaminase bastante superiores (entre 2 a 8 vezes mais) (**Gráfico 1**). Este resultado vem mais uma vez demonstrar o sucesso e eficácia da transformação das estirpes utilizadas neste trabalho.

Através da comparação da actividade enzimática da ACC desaminase das estirpes de *Mesorhizobium* transformadas com outras estirpes produtoras de ACC desaminase, verifica-se que os valores de actividade enzimática obtidos neste trabalho são bastante aceitáveis (**Tabela 4**).

Tabela 4- Valores da actividade enzimática da ACC desaminase de várias estirpes bacterianas.

Estirpe	Actividade enzimática*	Referência
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 128C53K	1,06	Ma <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 128C53	0,78	Ma <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 128C53G	0,93	Ma <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 128Sm	1,56	Ma <i>et al.</i> , 2003 a
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 128Sm (pWM2)	3,97	Ma <i>et al.</i> , 2003 a
<i>Rhizobium gallicum</i> PB2	0,08	Duan <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium hedysari</i> ATCC43676	0,20	Duan <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhizobium leguminosarum</i> PB45	0,14	Duan <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas putida</i> UW4	21,23	Ma <i>et al.</i> , 2003 b
<i>Pseudomonas putida</i> CAL2	0,48	Shah <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> DH5a/p4U2	0,29	Shah <i>et al.</i> , 1998
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB20	0,10	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2006
<i>Methylobacterium fujisawaense</i> CBMB110	0,03	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2006

* $\mu\text{mol } \alpha\text{-cetobutirato/mg proteína/hora}$.

5.4 Análise da taxa de reversão

A taxa de reversão da estirpe T-1-Telhado transformada (utilizada no ensaio em plantas) foi analisada ao fim de se verificar a estabilidade do plasmídeo pRKACC nesta estirpe sob condições “*in vitro*” e após relação simbiótica.

Em condições “*in vitro*” verifica-se que ao fim de 120 horas (5ª passagem) apenas 1,5% das bactérias mantêm o plasmídeo pRKACC. Existe uma taxa de reversão ao fenótipo “wild type” na ordem dos 98,5% (**Tabela 5**).

Tabela 5- Análise “*in vitro*” da taxa de reversão da estirpe T-1-Telhado pRKACC.

Tempo (h)	% de bactérias transformadas
24	43,8
48	38,5
72	9,3
96	1,7
120	1,5

É de notar que mesmo num período inicial (ao fim de 24 horas) observa-se uma taxa de reversão de cerca de 60%. Este resultado vem indicar que sem a presença de uma pressão selectiva, a estirpe transformada não replica o plasmídeo pRKACC acabando por o perder.

Sem a presença de uma pressão selectiva (tetracilina ou ACC) o plasmídeo pRKACC poderá tornar-se desnecessário à estirpe transformada, visto que não lhe confere qualquer resistência ou vantagem. Assim sendo, a estirpe transformada poderá deixar de replicar o plasmídeo, poupando alguma energia que lhe pode ser útil para outras actividades celulares.

Foi observado que a velocidade de crescimento da estirpe “wild type” em placa é bastante superior (cerca de 2x) à da estirpe transformada nas mesmas condições (28°C). Este resultado indica que a replicação do plasmídeo pRKACC é um processo longo e que poderá ser bastante dispendioso do ponto de vista energético. Apesar das bactérias transformadas possuírem o plasmídeo pRKACC (conferindo resistência a 20 µg/ml de tetraciclina), é bastante provável que muitas destas não consigam sobreviver na placa com tetraciclina, visto que o processo de replicação do plasmídeo pRKACC é bastante lento. Alguns dos resultados aqui obtidos poderão estar influenciados por este facto.

Para uma análise mais fiável deveria ser utilizado ACC como agente de pressão selectiva, pois este não influencia de forma negativa (não é letal como a tetraciclina) o crescimento das estirpes. Neste trabalho não foi possível a utilização de ACC como agente de pressão selectiva devido à indisponibilidade do reagente ACC (que foi preferencialmente utilizado para a medição da actividade enzimática das diversas estirpes estudadas).

Neste trabalho apenas foi analisada a estirpe T-1-Telhado pRKACC. Resultados obtidos por Brígido, C., (resultados não publicados) demonstraram que outras estirpes de *Mesorhizobium* transformadas com pRKACC possuíam uma taxa de reversão elevada (semelhante aos resultados obtidos neste trabalho). Sabendo que várias estirpes de *Mesorhizobium* transformadas se comportam da mesma maneira, apenas foi analisada a estirpe transformada utilizada no estudo gnotobiótico.

Pela visualização da **figura 19**, verifica-se que a presença do plasmídeo pRKACC é assegurada após relação simbiótica demonstrando a sua possível utilização em condições de simbiose. Este resultado sugere que a presença de um gene *acdS* exógeno poderá trazer algumas vantagens à estirpe que a produz. Na planta existe a presença de ACC que poderá actuar como agente de pressão selectiva, levando a que a estirpe transformada mantenha o plasmídeo e que o utilize em sua vantagem.

As bactérias obtidas a partir dos nódulos possuem o aspecto característico de estirpes de *Mesorhizobium* após crescimento em placas de MLA contendo o corante vermelho do Congo (*Mesorhizobium*- coloração esbranquiçada; contaminação-coloração vermelha). As colónias apresentam um aspecto semi-translúcido e mucilaginoso característico do género *Mesorhizobium* (Somasegaren e Hoben, 1994).

No entanto, não foi possível uma análise quantitativa da reversão. O método utilizado para a desinfecção dos nódulos mostrou-se ineficaz. Em muitos dos casos, após desinfecção dos nódulos, não foi possível obter qualquer crescimento bacteriano. O método de desinfecção utilizado foi bastante severo. O tamanho e estado fisiológico dos nódulos são factores variáveis que podem estar relacionados com a eficácia do método de desinfecção. Todavia, é possível verificar, de forma relativa, que a reversão da estirpe transformada ao fenótipo “wild type” é bastante menor em condição simbiótica.

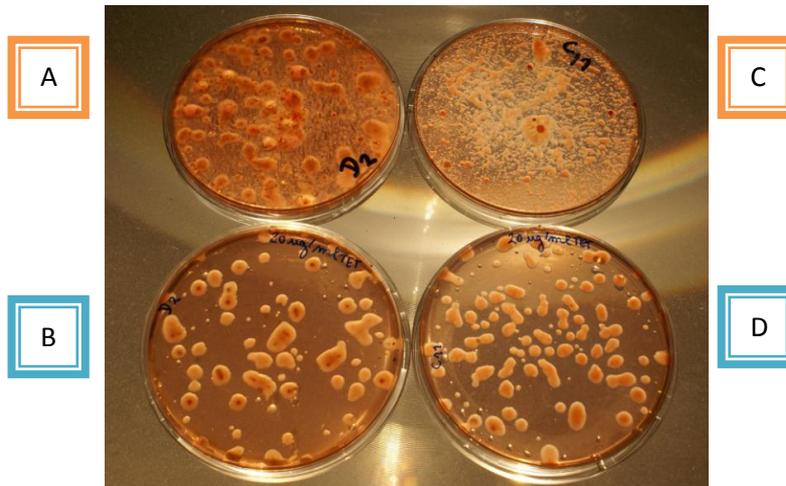


Fig.19- Análise qualitativa da reversão após transformação, através do crescimento em meio sólido de bactérias obtidas a partir de nódulos.

- A- Crescimento de bactérias obtidas a partir de nódulos de uma planta inoculada com a estirpe T-1-Telhado pRKACC, sujeita a condições normais.
- B- Crescimento de bactérias obtidas a partir de nódulos de uma planta inoculada com a estirpe T-1-Telhado pRKACC, sujeita a condições normais. Crescimento em placa contendo 20 µg/ml de tetraciclina.
- C- Crescimento de bactérias obtidas a partir de nódulos de uma planta inoculada com a estirpe T-1-Telhado pRKACC, sujeita a condições de stresse (encharcamento).
- D- Crescimento de bactérias obtidas a partir de nódulos de uma planta inoculada com a estirpe T-1-Telhado pRKACC, sujeita a condições de stresse. Crescimento em placa contendo 20 µg/ml de tetraciclina.

6. Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre *Mesorhizobium* e *Cicer arietinum* (Condições normais)

6.1 Número de nódulos

Em condições normais, verifica-se que, o factor transformação induz diferenças significativas ($P < 0,05$) no número de nódulos formados (**Gráfico 2**). Plantas inoculadas com bactérias transformadas apresentam um número de nódulos superior (92 vs 46) ao número de nódulos formados na planta inoculada com a estirpe “wild type”.

Este resultado demonstra que, em condições normais, a estirpe T-1-Telhado ao expressar um gene *acdS* exógeno, aumenta a sua capacidade de nodular a planta de grão-de-bico em cerca de 100%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ma *et al.*, (2004) na estirpe *Sinorhizobium meliloti*, que após transformação com o gene *acdS* de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 128C53K aumentou a sua capacidade de nodular “luzerna” (*Medicago sativa*) em cerca de 35%.

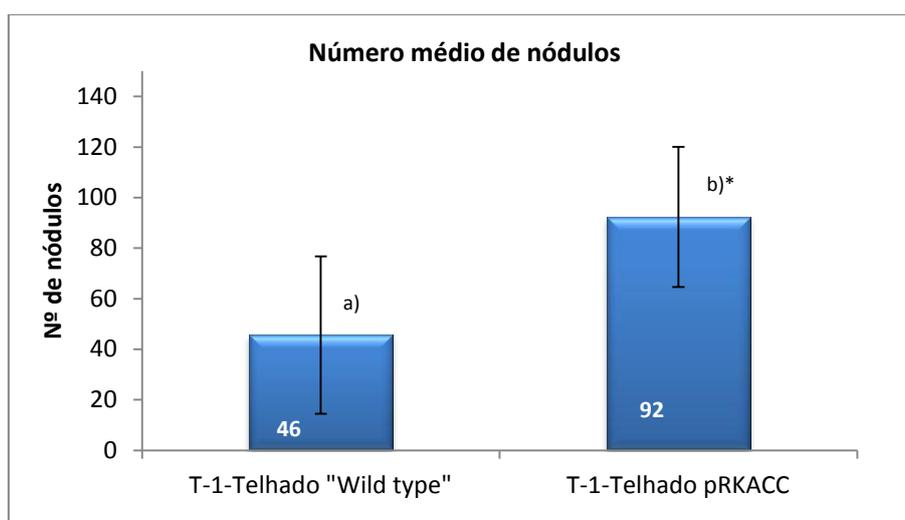


Gráfico 2- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão. *letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Numa análise do processo de nodulação ao longo do tempo observa-se que a estirpe transformada forma sempre mais nódulos sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) após 45 dias de ensaio (**Gráfico 3**).

Enquanto o número de nódulos formados pela estirpe “wild type” se mantém constante ao longo do tempo, o mesmo não acontece com a estirpe transformada. Este resultado poderá indicar que a ação do gene *acdS* exógeno pode modificar o sistema de regulação da formação de nódulos mediado pelo etileno, permitindo à estirpe transformada formar nódulos em mais do que uma ocasião.

A estirpe “wild type” ao não possuir o gene *acdS* exógeno não consegue modular o sistema de regulação da formação de nódulos mediado pelo etileno, logo este processo vai ocorrer de forma normal, ou seja, ocorre uma formação inicial de nódulos

que cessa quando existe um número de nódulos suficiente para satisfazer as necessidades da planta.

Sabe-se que o etileno é um dos principais moduladores do sistema de regulação de formação de nódulos em leguminosas. O etileno inibe a formação de nódulos em vários processos, nomeadamente, no número, progressão e persistência das infecções por rizóbio (Gage, 2004).

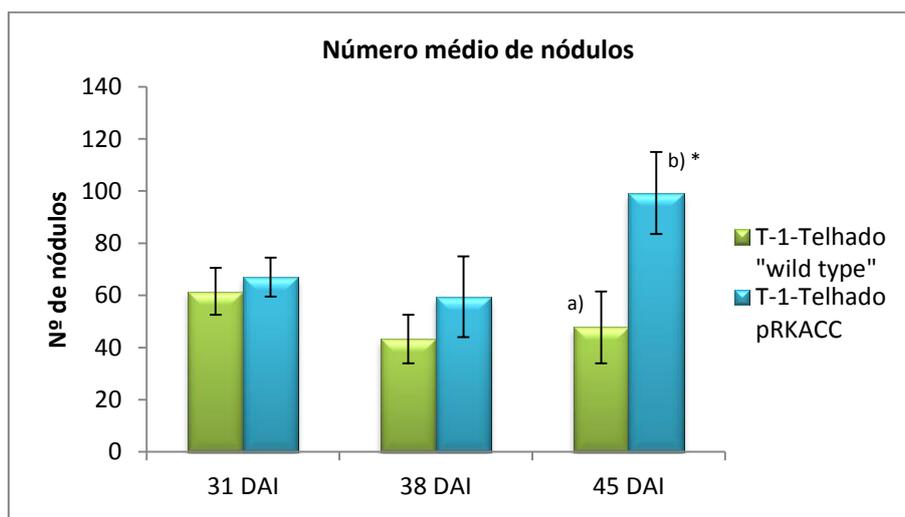


Gráfico 3- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento ao longo das 3 colheitas (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-). No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão. *letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

A estirpe transformada ao possuir o gene *acdS* exógeno poderá conseguir diminuir os níveis gerais de etileno que afectam a nodulação e ganhar vantagem sobre a estirpe “wild type” em qualquer uma das fases ou processo de infecção:

-Número de infecções

A estirpe transformada ao possuir um gene *acdS* exógeno que lhe permite a expressão de ACC desaminase em condições de vida livre, poderá tornar-se mais competitiva e eficiente. Foi demonstrado por Glick e colaboradores (1999) que estirpes bacterianas produtoras de ACC desaminase conseguem utilizar os produtos da degradação do ACC, amónia e α -cetobutirato, como fontes de azoto e carbono respectivamente, obtendo fontes de energia suplementar.

Com mais recursos disponíveis a estirpe transformada poderá desenvolver-se e multiplicar-se mais rapidamente. Ao aumentar o seu número e a sua viabilidade é possível que consiga promover um maior número de infecções efectivas (**Figura 20**).

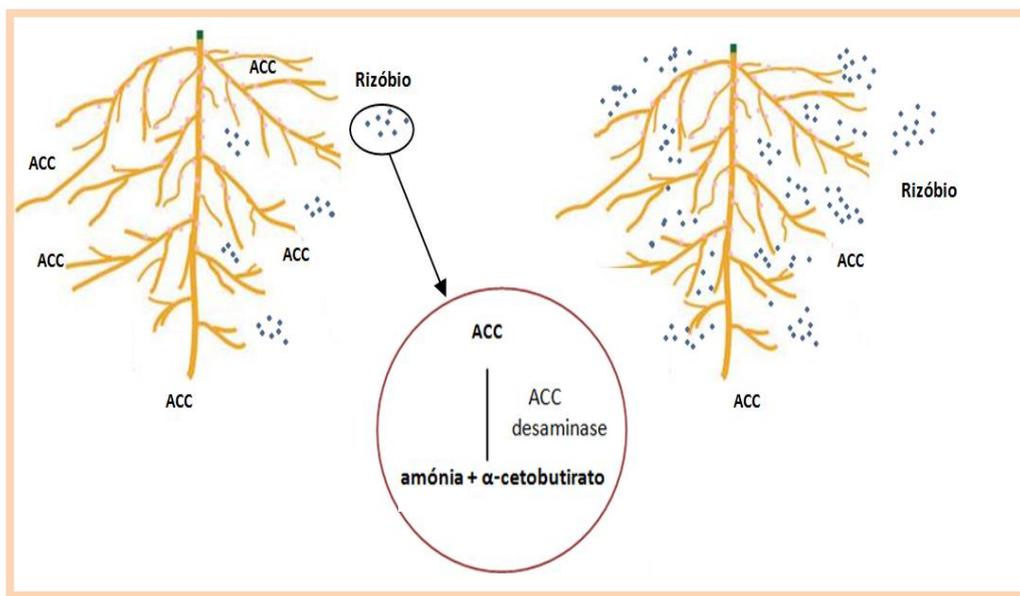


Fig.20- Esquema representativo da utilização dos produtos de degradação do ACC e sua vantagem na multiplicação e viabilidade celular da estirpe de *Mesorhizobium* transformada.

O etileno influencia o sistema de sinalização e percepção dos factores *Nod* bacterianos pela planta (Oldroyd *et al.*, 2001). O etileno inibe o processo de “*calcium spiking*” responsável pela percepção do factor *Nod* bacteriano, inibindo a consequente expressão de genes como *RIP1* e *ENOD11* responsáveis pela resposta primária da planta ao processo de nodulação (Oldroyd *et al.*, 2001). Pensa-se que a via de transdução de sinal do etileno esteja relacionada com a via de transdução de sinal dos factores *Nod*. O etileno poderá inibir tanto os processos anteriores ao “*calcium spiking*” como o próprio processo em si. Apesar de não ser conhecido qual o mecanismo de acção, sabe-se que o etileno inibe, de facto, o processo de “*calcium spiking*” e a consequente activação de genes dependentes deste (Oldroyd *et al.*, 2001).

A expressão do gene *acdS* exógeno por parte da estirpe transformada poderá levar a uma diminuição dos níveis de etileno, permitindo assim uma menor inibição da percepção dos factores *Nod* na planta e a consequente expressão de genes que iniciam o processo de formação de nódulos. Isto poderá resultar num maior número de infecções efectivas (**Figura 21**).

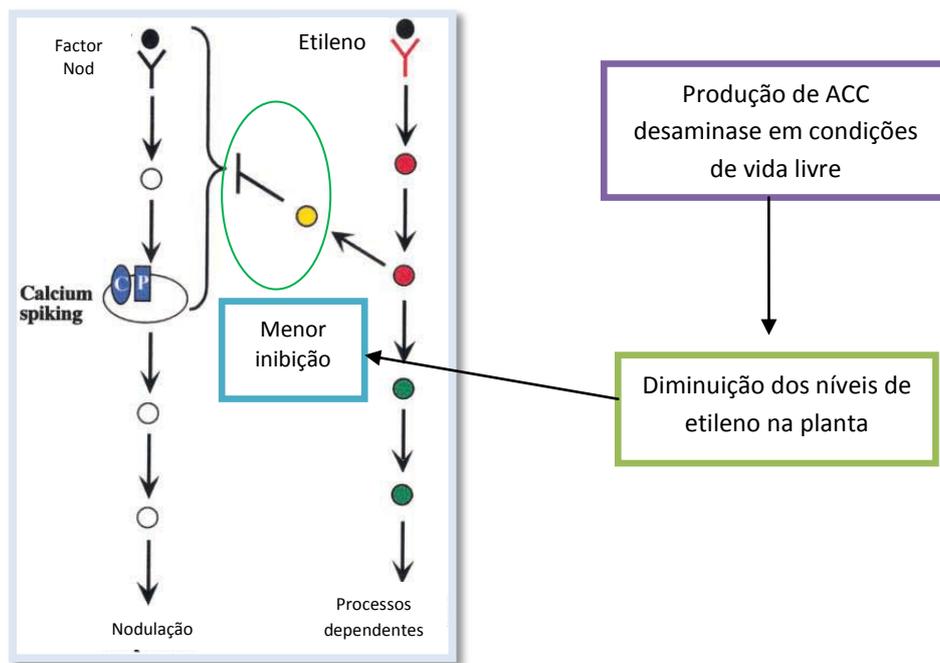


Fig.21- Esquema representativo da acção do etileno no processo de percepção dos factores Nod (adaptado de Oldroyd *et al.*, 2001) e o possível papel da acção da enzima ACC desaminase (produzida em condições de vida livre) na modulação deste processo.

- Progressão e persistência das infecções

Guinel e Geil (2002) propõem que o principal local de acção do etileno é a zona da epiderme e a zona cortical da raiz da planta. É precisamente nesses locais que o cordão de invasão se forma e progride até atingir o nódulo primordial. Penmetsa e Cook (1997) demonstraram que o processo de formação do cordão de invasão é inibido pelo etileno. Num estudo realizado por Lee e La Rue (1992) verificou-se que o etileno inibe a progressão do cordão de invasão na zona do córtex radicular de *Medicago sativa* (“luzerna”) existindo evidências de que o destino das infecções efectuadas pelo rizóbio no pêlo radicular das plantas leguminosas é regulado pelos níveis de etileno (Abeles *et al.*, 1992; Wisniewski *et al.*, 2000; Guinel e Geil, 2002)

O etileno está também envolvido no sistema de defesa contra patógenos (Abeles *et al.*, 1992). Na planta *Medicago sativa* (“luzerna”) ocorre uma indução do sistema de defesa da planta, nomeadamente a indução da biossíntese de etileno, após inoculação com uma estirpe compatível de rizóbio (Ligero *et al.*, 1986). Pensa-se que o etileno sintetizado nesta fase possa estar relacionado com os níveis de vingamento dos cordões de invasão e sua consequente progressão e persistência (Ma *et al.*, 2004).

Neste sentido a estirpe transformada poderá conseguir diminuir os níveis gerais de etileno na planta, levando a uma diminuição dos efeitos deletérios do etileno na formação do cordão de invasão e na sua conseqüente progressão e persistência até atingir o nódulo primordial.

O etileno além de inibir os processos de infecção da planta por rizóbio, também inibe a divisão celular na raiz da planta (Goodlass e Smith, 1979), um processo fundamental para a formação do nódulo.

Ao diminuir os níveis de etileno na planta, a estirpe transformada poderá levar a uma diminuição da inibição de todos os processos dependentes do etileno, ocorrendo um aumento dos nódulos formados.

O modo pelo qual a estirpe transformada diminui os níveis de etileno poderá ser o mesmo utilizado por outras bactérias como *Pseudomonas putida* UW4 (Glick, 1997) (Figura 22).

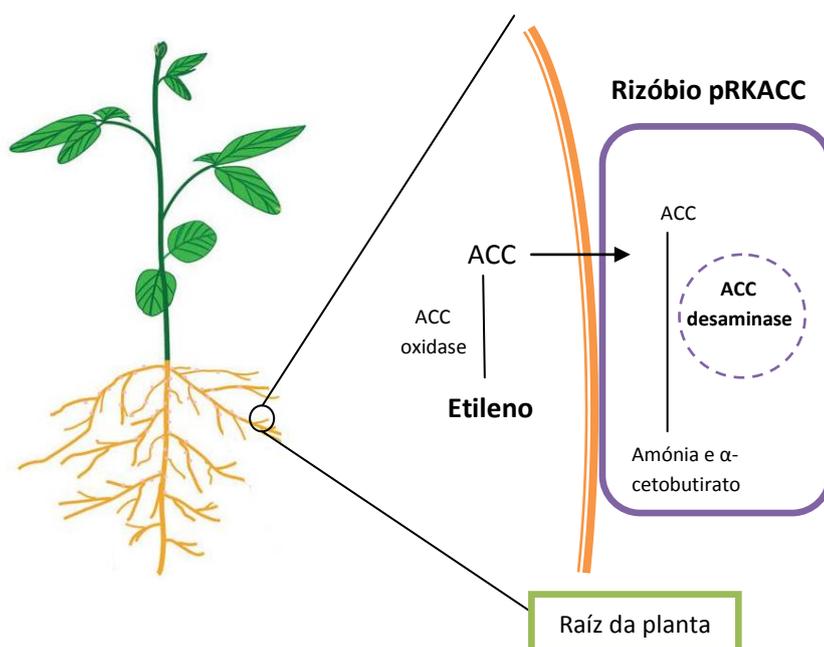


Fig.22- Esquema representativo do mecanismo pelo qual a estirpe de *Mesorhizobium* transformada poderá diminuir os níveis de etileno na planta de grão-de-bico.

Nem todas as bactérias presentes na raiz vão infectar e formar nódulos na planta, algumas bactérias apenas se ligam à raiz a fim de obter os nutrientes (produtos da fotossíntese exsudados pela raiz) que necessitam para a sua sobrevivência (Smit *et al.*,

1991). A estirpe transformada ao expressar ACC desaminase em condições de vida livre poderá promover o contacto com a raiz da planta, ligando-se à mesma, obtendo o ACC directamente. Ao se ligar à planta esta vai actuar como um reservatório acumulando e degradando ACC e assim diminuir os níveis gerais de etileno na planta. Este mecanismo, descrito por Glick *et al.*, (2007), é o mecanismo utilizado por quase todas as bactérias produtoras de ACC desaminase, contudo, é inexistente ou não conhecida em estirpes de *Mesorhizobium*.

Este mecanismo poderá trazer alguma vantagem à estirpe transformada quando em comparação com a estirpe “wild type”, que ao não possuir o gene *acdS* exógeno não é capaz de diminuir os níveis gerais de etileno.

6.2 Peso seco de nódulos

O peso seco dos nódulos das plantas inoculadas com a estirpe transformada é cerca de duas vezes superior ao peso seco dos nódulos das plantas inoculadas com a estirpe “wild type” (**Gráfico 4**).

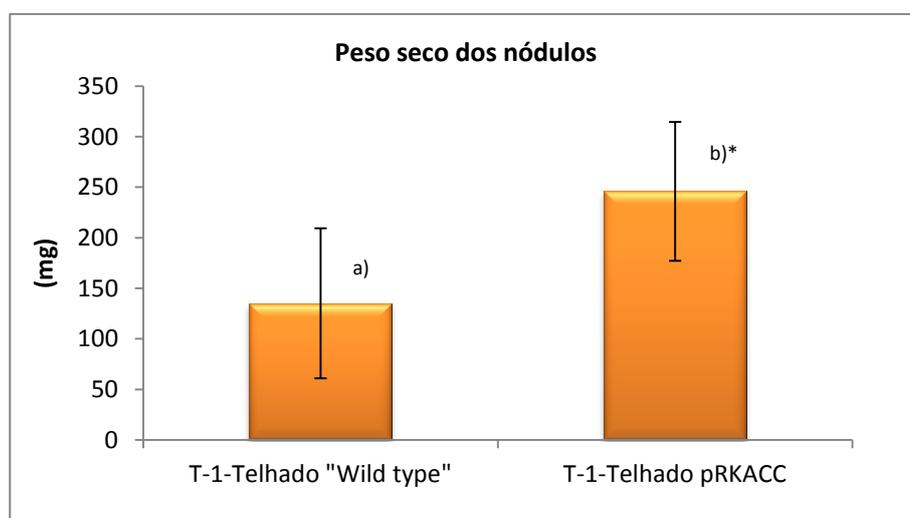


Gráfico 4- Peso seco dos nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão. *letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

No entanto, no valor do peso por nódulo (**Gráfico 5**) não são encontradas diferenças significativas entre os dois tratamentos.

Obtêm-se valores semelhantes de peso por nódulo em ambos tratamentos. Este resultado poderá indicar que a utilização do gene *acdS* exógeno pela estirpe transformada, adquira uma maior importância no processo de formação de nódulos e desenvolvimento inicial dos mesmos e não na sua função específica, isto é, a capacidade em fixar o N₂ atmosférico.

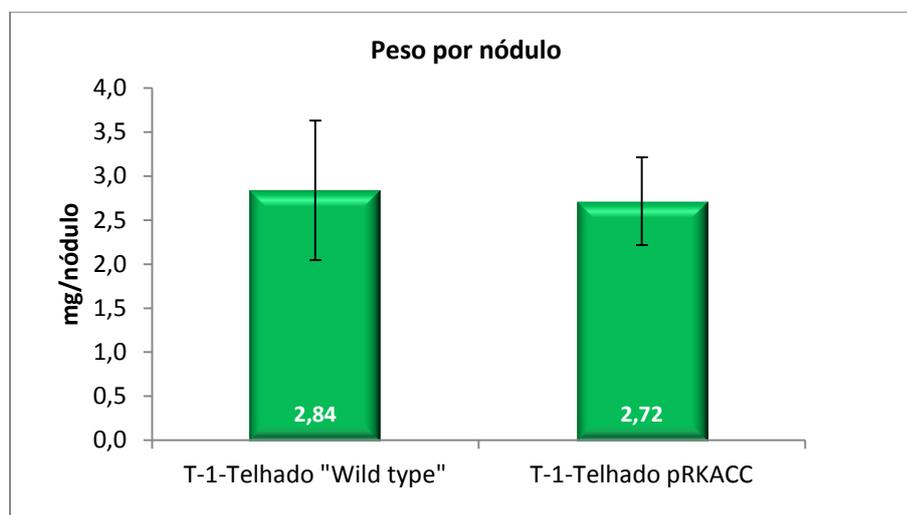


Gráfico 5- Peso médio de cada nódulo formado pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Da observação do desenvolvimento da simbiose ao longo do tempo pode-se verificar que 31 DAI existem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os valores do peso por nódulo de cada tratamento (**Gráfico 6**). Plantas inoculadas com a estirpe transformada possuem nódulos mais desenvolvidos. Isto poderá demonstrar que a utilização do gene *acdS* exógeno traz vantagens significativas numa fase inicial de infecção e formação de nódulos.

A expressão do gene *acdS* exógeno poderá ajudar numa redução inicial dos níveis de etileno, visto que este pode ser utilizado em condições de vida livre. Na estirpe “wild type” não existe a presença deste gene *acdS* exógeno, logo, em condições de vida livre esta estirpe não consegue produzir ACC desaminase (como comprovado através da medição da actividade enzimática- **tabela 3**). Se não produz ACC desaminase não é capaz de diminuir os níveis iniciais de etileno que inibem a formação e desenvolvimento de nódulos e como resultado forma nódulos em menor quantidade e menos desenvolvidos.

No entanto, 38 DAI verifica-se que já não existe qualquer diferença significativa no peso por nódulo entre os dois tratamentos. Existe uma “recuperação” por parte da estirpe “wild-type”.

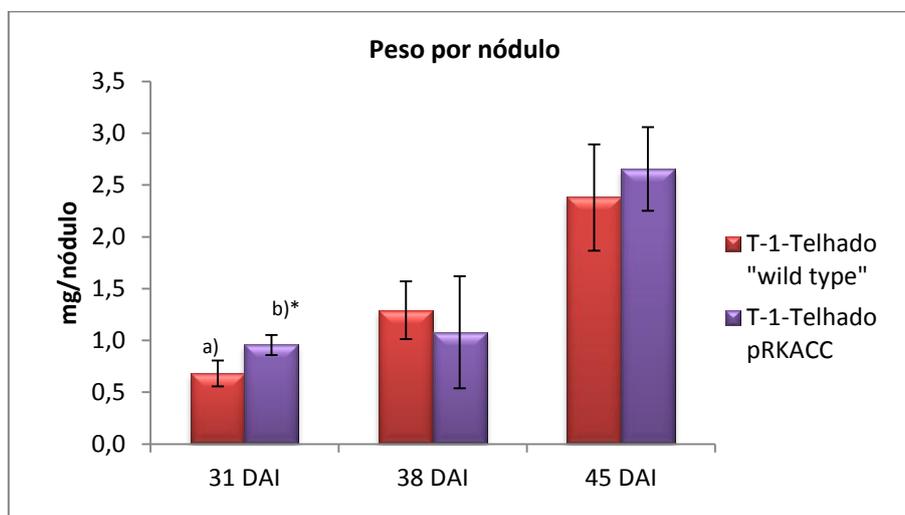


Gráfico 6- Peso médio de cada nódulo formado pelas estirpes “wild type” e transformada em 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-), sob condições normais. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento ao longo das 3 colheitas. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão. *letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

A presença de um gene *acdS* na estirpe “wild type” (como comprovado pelo método de hibridação de Southern) poderá ser a causa para a obtenção deste resultado. Assumindo que o gene *acdS* detectado na estirpe “wild type” é semelhante ao gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, será possível que a sua expressão seja regulada de forma idêntica, isto é, que apenas ocorra dentro dos nódulos e sob controlo de genes simbióticos como *nifA*. Se assim for, ACC desaminase é produzida no interior dos nódulos levando a uma diminuição dos níveis de etileno no interior dos mesmos, possibilitando o seu desenvolvimento (**Figura 23**). Esta diminuição dos níveis de etileno no nódulo poderá levar ao aumento do desenvolvimento dos nódulos, explicando assim a “recuperação” da estirpe “wild type”.

Contudo, mais estudos serão necessários para comprovar a actividade do gene *acdS* existente na estirpe “wild type”. Será necessária a utilização de novos métodos de detecção da actividade enzimática da ACC desaminase que possibilitem a sua medição dentro dos nódulos.

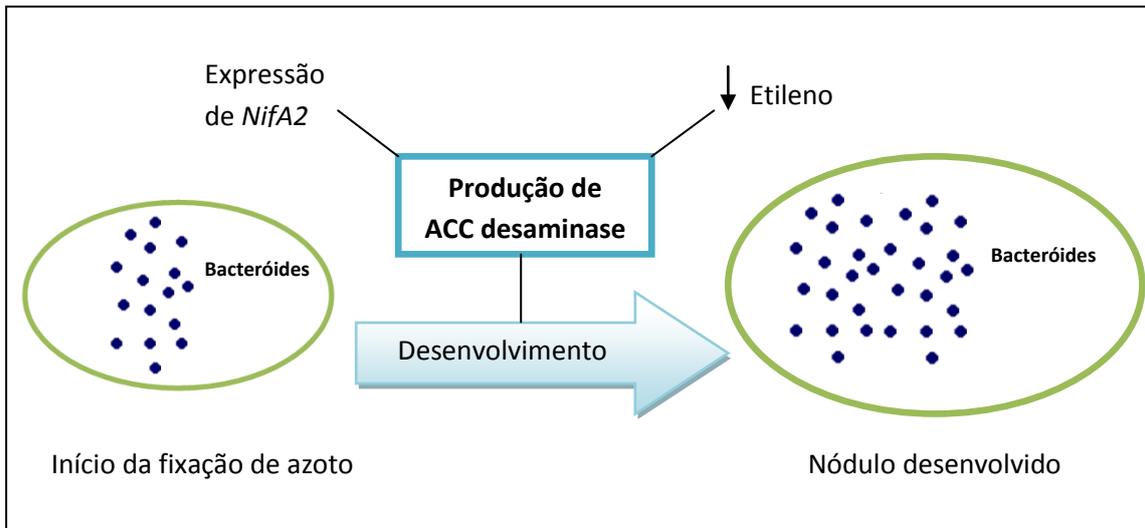


Fig.23- Esquema representivo do mecanismo de acção do gene *acdS* de *M.loti* MAFF303099. Este mecanismo poderá ser utilizado pela estirpe T-1-Telhado “wild type”.

6.3 Actividade do complexo enzimático nitrogenase

Através da visualização do **gráfico 7**, verifica-se que o factor transformação não afecta de forma significativa a actividade específica da enzima nitrogenase, 45 DAI. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo desenvolvido por Ma *et al.*, (2003^a), onde se verificou que a estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128Sm mutante (“knockout” do gene *acdS*) possuía a mesma actividade específica da enzima nitrogenase que a estirpe não mutante e produtora de ACC desaminase. Este resultado sugere que a utilização da enzima ACC desaminase apenas está relacionada com o processo de formação e desenvolvimento dos nódulos e não com a sua função (fixação de azoto), como já tinha sido proposto anteriormente.

Através da análise temporal da actividade do complexo enzimático nitrogenase (**Tabela 6**) verifica-se que não existem quaisquer diferenças significativas entre tratamentos mesmo ao longo dos diferentes tempos de colheita.

Se a produção e utilização de ACC desaminase afectasse de algum modo a actividade do complexo nitrogenase, seria de esperar que existissem diferenças significativas entre os dois tratamentos, tal como o que acontece no parâmetro peso por nódulo (**Gráfico 6**). No entanto, não se verifica qualquer diferença estatisticamente significativa. Este resultado demonstra que a enzima ACC desaminase não está directamente relacionada com a fixação de azoto realizada pela bactéria simbiote.

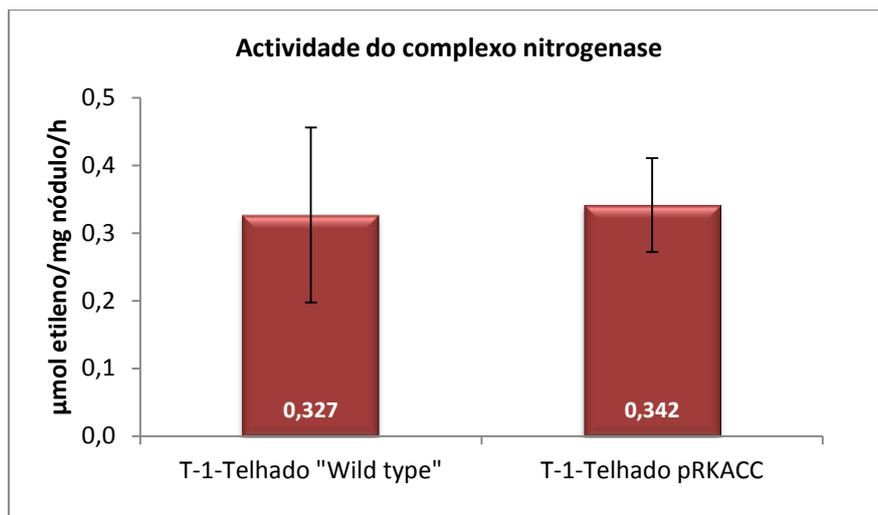


Gráfico 7 - Actividade do complexo enzimático nitrogenase por peso de nódulo em plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Tabela 6 - Actividade específica do complexo enzimático nitrogenase nos diversos tratamentos ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação- DAI-), em condições normais. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento.

Tratamento	DAI	Etileno produzido (µmol)	Peso seco dos nódulos (mg)	Actividade do complexo enzimático nitrogenase (nmol etileno/ mg nódulo/h)
T-1-Telhado “wild type”	31	2,6 ± 2,6	40,9 ± 4,7	59,1 ± 59,3
	38	49,1 ± 8,0	52,1 ± 7,2	981,5 ± 212,8
	45	39,6 ± 10,3	109,2 ± 30,4	362,3 ± 53,1
T-1-Telhado pRKACC	31	6,6 ± 3,2	63,6 ± 6,45	109,9 ± 61,5
	38	69,1 ± 24,1	56,6 ± 12,8	1040,9 ± 295
	45	98,2 ± 13,5	257,8 ± 34,8	389,0 ± 68,2

6.4 Biomassa total

Através da visualização do **gráfico 8**, observa-se que existem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) na biomassa de plantas inoculadas com a estirpe “wild type” e transformada.

Verifica-se que a estirpe de *Mesorhizobium* T-1-Telhado transformada com o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 consegue promover o crescimento da planta de grão-de-bico em cerca de 74%, em comparação com a estirpe “wild type”.

Os resultados observados sugerem que a transformação de estirpes de *Mesorhizobium* com o gene *acdS* poderá trazer vantagens significativas a nível de formação de nódulos e consequente desenvolvimento da planta. A sua utilização em campo poderá aumentar a produtividade de algumas plantações de extrema importância económica e biológica. Todavia, mais estudos serão necessários para confirmar a eficácia destas estirpes transformadas em situações “de campo”.

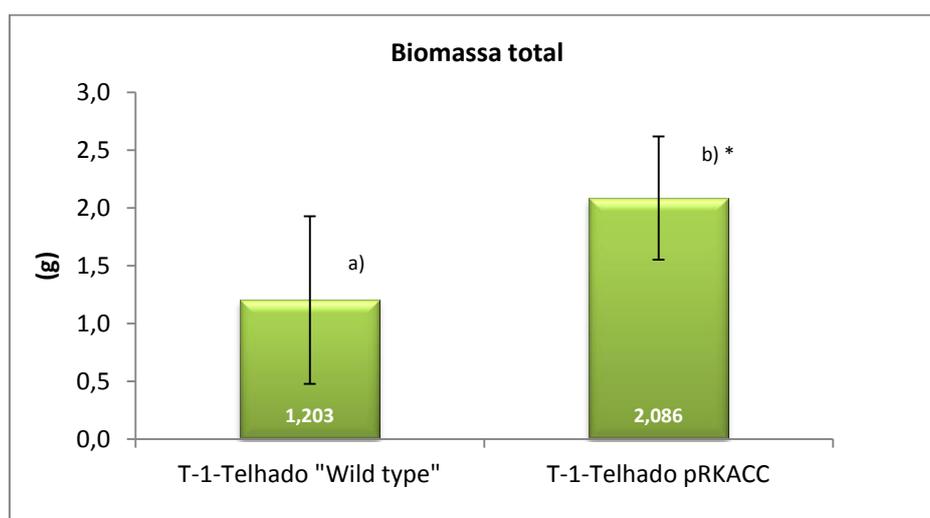


Gráfico 8- Biomassa total de plantas inoculadas com estirpe “wild type” ou transformada, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão. *letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

7. Avaliação do efeito da ACC desaminase na simbiose entre *Mesorhizobium* e *Cicer arietinum* (Condições de encharcamento)

7.1 Número de nódulos

Em condições de stresse o factor transformação não traz diferenças significativas a nível de formação de nódulos. Neste caso o factor de stresse parece sobrepôr-se ao factor transformação.

As plantas inoculadas com a estirpe T-1-Telhado “wild type” apresentam um número de nódulos semelhante ao das plantas inoculadas com a estirpe T-1-Telhado transformada (84 vs. 85) (**Gráfico 9**).

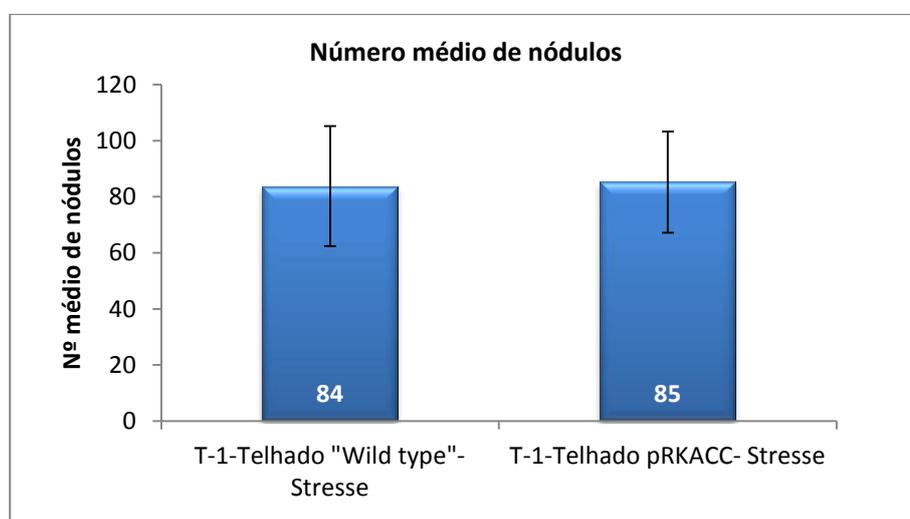


Gráfico 9- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação (17 dias após remoção do stresse). Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Era esperado que a estirpe transformada formasse mais nódulos tal como acontece em condições normais, contudo, isso não se verifica. Este resultado sugere que em condições de encharcamento, a presença de um gene *acdS* exógeno não traz quaisquer vantagens em termos de formação de nódulos.

A inexistência de diferenças significativas poderá ocorrer devido ao facto de a estirpe transformada não conseguir diminuir os níveis gerais de etileno na planta como o que parece acontecer em condições normais, ou, por existir algum outro mecanismo de regulação da nodulação que se sobreponha ao efeito do etileno.

O factor stressse parece desencadear fenómenos que modificam o processo de nodulação. O número de nódulos formados pela estirpe “wild type” em condições de stressse é bastante superior ao número de nódulos formados pela mesma em condições normais (84 vs 46) (**Gráfico 10**).

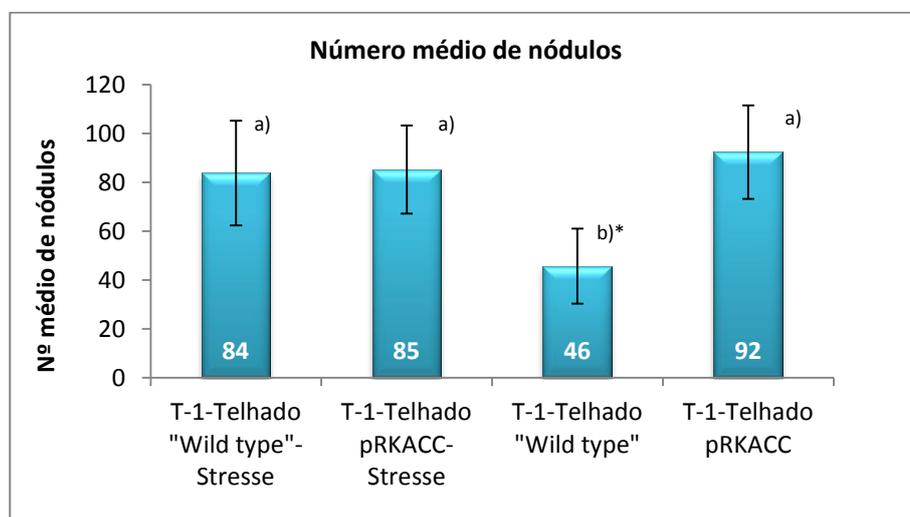


Gráfico 10- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada, em condições normais e stressse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.*letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Resultados semelhantes foram obtidos por Gallacher e Sprent (1978) na planta *Vicia faba* (“Fava”). No trabalho realizado por estes autores observou-se que duas semanas após remoção do stressse (encharcamento), ocorreu uma duplicação do número de nódulos formados quando em comparação com o controlo (planta sujeita a condições normais).

O mesmo resultado é observado neste trabalho (**Gráfico 11**). Duas semanas após a remoção do stressse (45 DAI), verifica-se um aumento significativo do número de nódulos.

Resultados obtidos por Brígido, C (resultados não publicados) demonstram que são necessárias 3 a 4 semanas para ocorrer uma formação de nódulos visíveis na planta de grão-de-bico. É bastante provável que a formação de novos nódulos (+30) observada 45 DAI, tenha ocorrido em condições de encharcamento ou logo após o seu término.

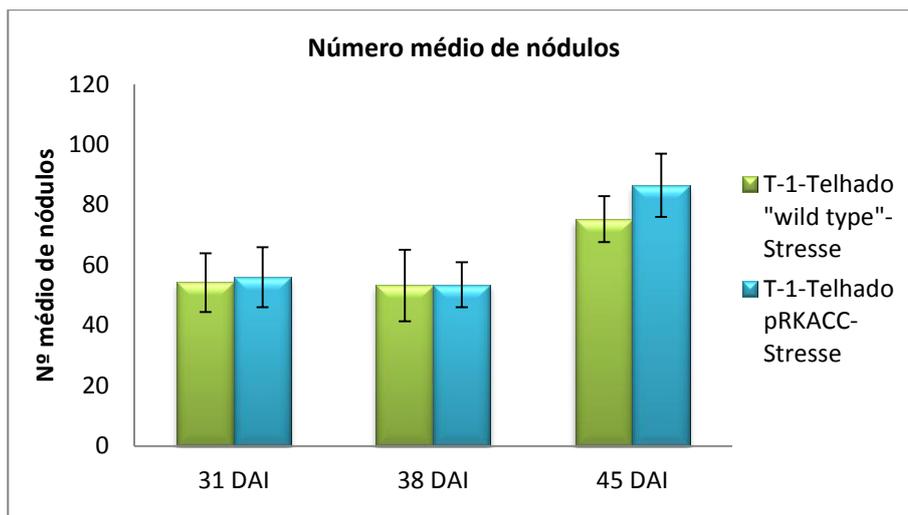


Gráfico 11- Número médio de nódulos formados pelas estirpes “wild type” e transformada ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-), em condições de stresse. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Em condições de encharcamento devido à limitação de oxigénio, o ACC (substrato da enzima ACC desaminase) deixa de ser libertado pelas raízes e passa a ser transportado para o caule, pois é necessária a presença de oxigénio para ocorrer a conversão de ACC a etileno por parte da enzima ACC oxidase (Bradford e Yang, 1980; Else e Jackson, 1998). Assim, se o ACC passa a ser transportado para o caule para posterior conversão em etileno, é possível que os níveis de etileno na raiz estejam diminuídos. Grichko e Glick (2000) verificaram que na planta *Lycopersicon esculentum* (“tomateiro”), a libertação de ACC para o ambiente radicular diminui ao longo do tempo cessando após 150 horas de encharcamento.

Ao diminuir os níveis de ACC e consequentemente os níveis de etileno na raiz é provável que deixe de ocorrer uma inibição do processo de nodulação. Processos que antes seriam inibidos devido à presença de etileno, poderão deixar de o ser, aumentando a formação de novos nódulos (**Figura 24**).

Este fenómeno poderá explicar a inexistência de diferenças significativas entre estirpe transformada e estirpe “wild type”. Com pouco ou nenhum ACC a ser exsudado pela raiz, a estirpe transformada deixa de possuir a única vantagem que tem em relação à estirpe “wild type”- a diminuição dos níveis de etileno através da produção de ACC desaminase em condições de vida livre.

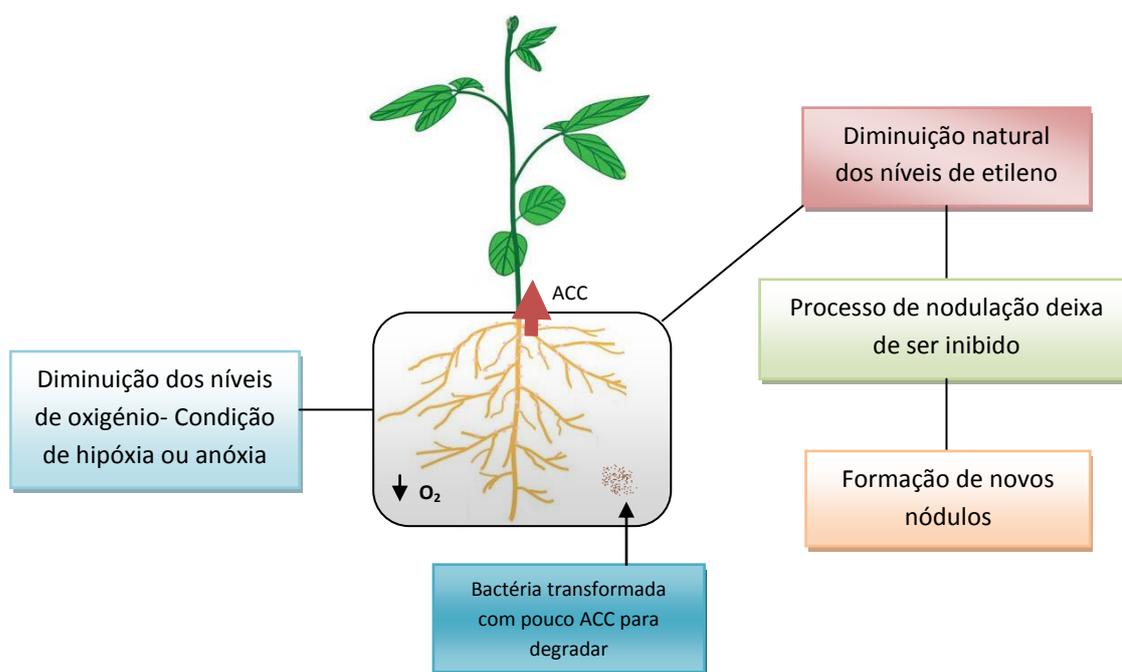


Fig.24- Representação esquemática de um processo possivelmente responsável pela ausência de diferenças significativas no número de nódulos entre tratamentos.

Outra explicação para os resultados obtidos poderá residir no facto de que em condições de stresse outros mecanismos de regulação da formação de nódulos poderão ser activados e que estes poderão não depender do etileno. Em condições de encharcamento os níveis de etileno na planta estão bastante alterados (Grichko e Glick, 2000), logo é bastante provável que a planta utilize outros mecanismos para a regulação da formação de nódulos.

O encharcamento afecta negativamente a actividade da enzima nitrogenase e a consequente fixação de azoto efectuada pelas bactérias simbiotes (Sprent, 1969, 1971; Minchin e Pate, 1975). A aquisição de azoto (nitratos) pela raiz é também significativamente alterada em plantas leguminosas submetidas a condições de encharcamento (Yadav *et al.*, 2007).

Plantas sujeitas a encharcamento mas suplementadas com nitrato, são muito menos afectadas pelo stresse (Minchin e Pate, 1975). Estes resultados demonstram que a presença de azoto é fundamental para a resistência e recuperação da planta quando esta se encontra em condições de encharcamento.

Em condições de encharcamento é provável que a planta promova a captação de azoto para assim conseguir sobreviver. Uma das formas que a planta poderá encontrar para promover a obtenção de azoto será permitindo a entrada de mais bactérias simbiotes capazes de fixar azoto, ou desenvolvendo nódulos que se encontravam num estado de “dormência”.

É conhecida a importância que o nitrato possui na nodulação. Sabe-se que o nitrato poderá regular a nodulação indirectamente, através de múltiplos mecanismos de sinalização (Kinkema, *et al.*, 2006). A formação de nódulos é regulada por pelo menos duas vias de sinalização: a via de sinalização dependente do etileno e uma via de sinalização de longa distância (com comunicação entre raiz e caule). O nitrato poderá utilizar uma destas vias para garantir que a nodulação é terminada em condições ambientais onde esta não é necessária (Kinkema, *et al.*, 2006). Na planta de grão-de-bico, quando nitrato é fornecido à planta em altas concentrações observa-se um aumento da concentração de etileno (Nandwal, *et al.*, 2000). Na presença de altas concentrações de nitrato a formação de nódulos é inibida devido à estimulação da produção de etileno (Fern e La Rue, 1991; Ligerio *et al.*, 1991; Caba *et al.*, 1998; Schimdt *et al.*, 1999).

Em condições de encharcamento ocorre uma acumulação de azoto no caule de plantas de grão-de-bico (Cowie, *et al.*, 1996 b). É provável que a concentração de azoto na raiz da planta esteja bastante diminuída devido ao seu transporte para a parte aérea e à baixa fixação de azoto por parte das bactérias simbiotes. Se assim for, em condições de stresse a via de regulação pelo nitrato poderá estar modificada e levar a acontecimentos que antes não eram observados (em condições normais), levando a efeitos inesperados na nodulação. Se as concentrações de nitrato estão diminuídas então a sua regulação inibitória poderá deixar de ocorrer, permitindo a formação de nódulos (**Figura 25**).

Outras fitohormonas estão também relacionadas com o processo de nodulação. As auxinas estão directamente relacionadas com a formação de nódulos por rizóbio (Mathesius *et al.* 1998; Pacios-Bras *et al.* 2003). Os níveis de auxinas estão bastante elevados durante a iniciação da divisão celular que posteriormente vai originar o nódulo primordial. Contudo, a expressão de auxinas tende a diminuir à medida que o nódulo se diferencia. Verifica-se que a acumulação de auxinas é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento dos nódulos (Mathesius *et al.* 1998; Pacios-Bras *et al.* 2003).

Inibidores do transporte polar das auxinas (que promovem a acumulação de auxinas na raiz) induzem a formação de estruturas similares a nódulos em plantas como “luzerna” (Hirsch *et al.* 1989) ou “trevo” (Wu *et al.* 1996).

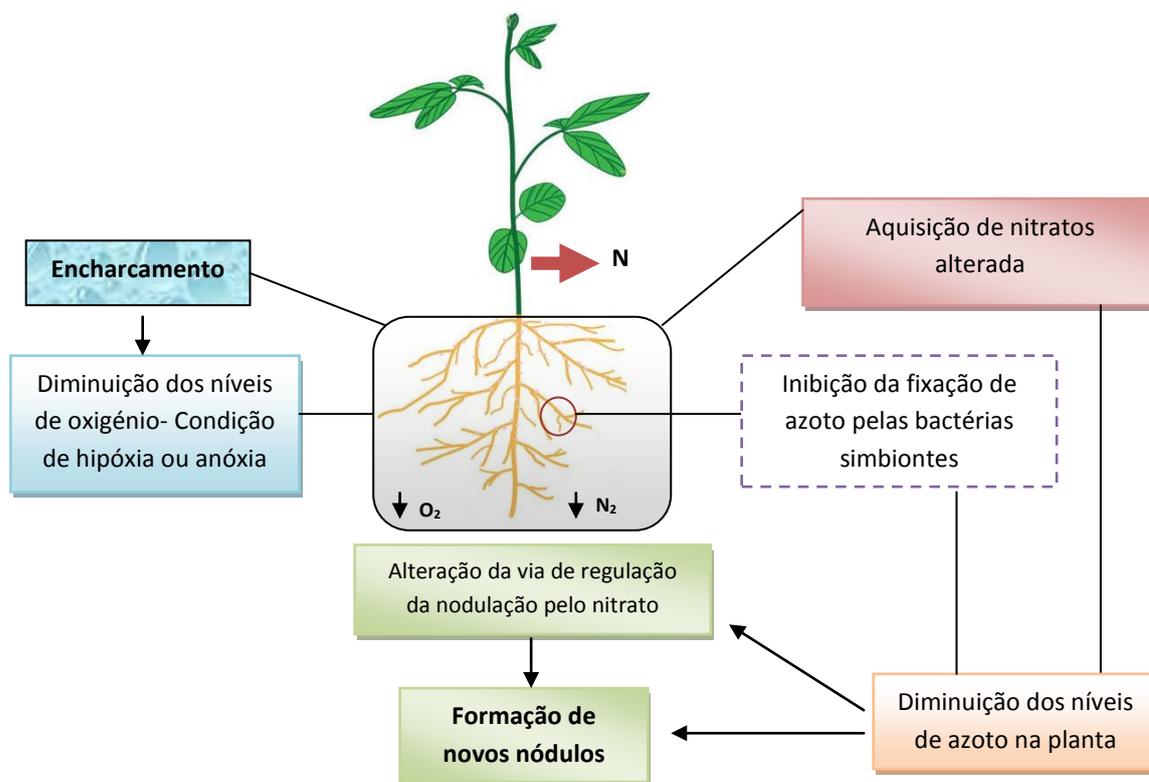


Fig.25- Representação esquemática de um processo dependente do nitrato possivelmente responsável pela ausência de diferenças significativas no número de nódulos entre tratamentos

Os flavonóides são conhecidos como inibidores do transporte polar de auxinas e pensa-se que estes estejam relacionados com a regulação da acumulação de auxinas nas células da raiz (Jacobs e Rubery, 1988).

Os flavonóides estão envolvidos nos mecanismos de resposta ao stresse (Etherington, 1983; Stafford e Ibrahim, 1992; Reuber *et al.*, 1996; Olsson *et al.*, 1998) assim como na interação planta leguminosa- bactéria simbiote. Os flavonóides são os principais responsáveis pela activação de genes *nod* na bactéria simbiote (Redmond *et al.*, 1986; Rossen *et al.*, 1987; Janczarek *et al.*, 1997; Gagnon e Ibrahim, 1997; Suominen *et al.*, 2003)

Em condições de encharcamento ocorre um aumento da produção de flavonóides pela planta (Francis e Devitt, 1969; De Rijke, *et al.*, 2005). Em condições de stresse os flavonóides poderão promover a acumulação de auxinas nas células da raiz levando a

um aumento do desenvolvimento de nódulos. Nódulos que antes seriam abortados agora poderão se desenvolver. Este facto poderá explicar a formação de novos nódulos em condições de stresse. Além disso, os flavonóides induzem a expressão dos factores Nod bacterianos, que estando em maior concentração na raiz da planta poderão induzir uma maior formação de nódulos (**Figura 26**).

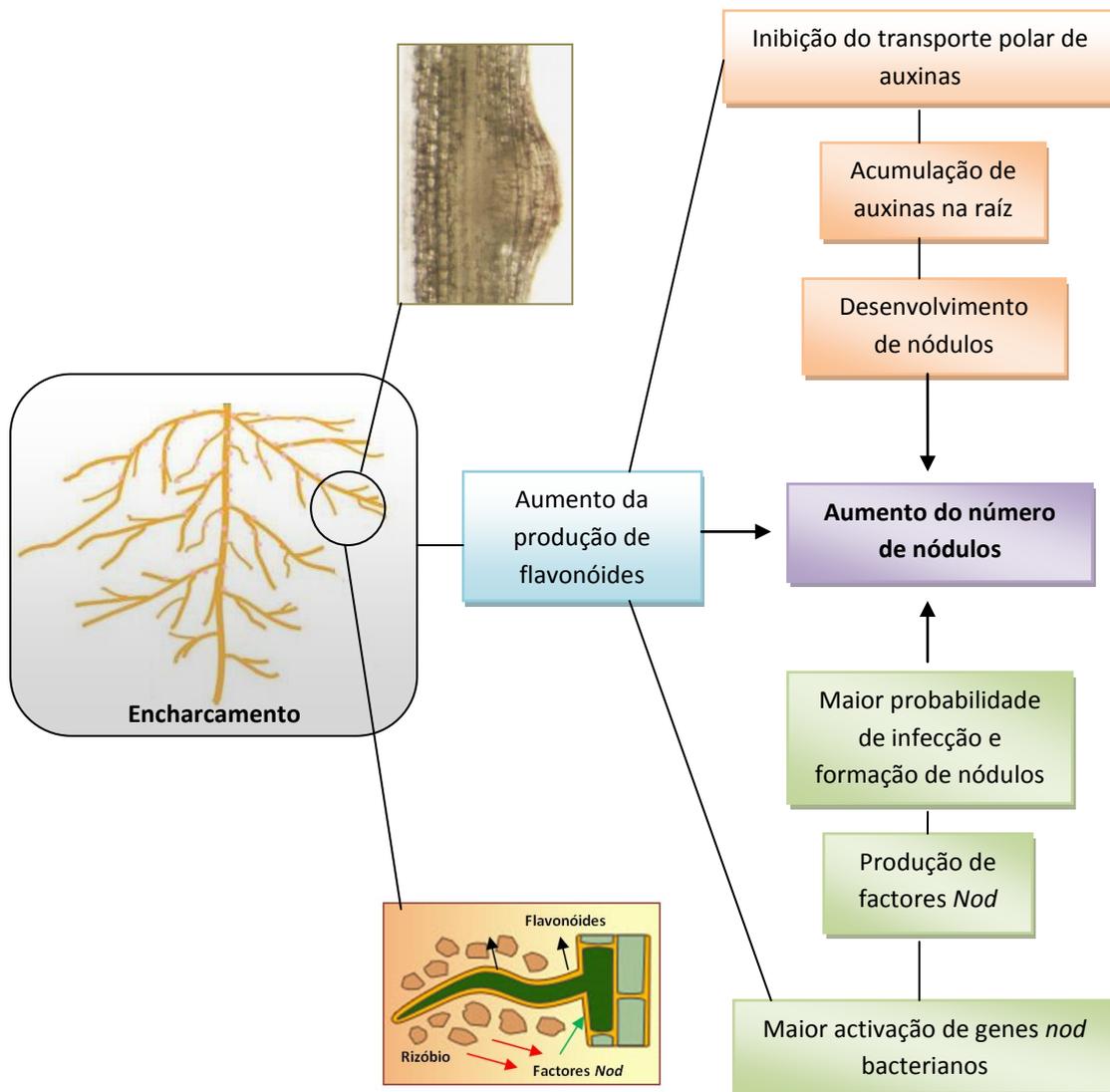


Fig.26- Possível mecanismo de regulação da nodulação em condições de encharcamento.

7.2 Peso seco nódulos

O peso seco dos nódulos obtidos nos diferentes tratamentos é semelhante. Este resultado está de acordo com o esperado, visto que ambos os tratamentos possuem o mesmo número de nódulos (**Gráfico 12**).

A relação entre peso/número de nódulos obtida nos dois tratamentos também é semelhante (**Gráfico 13**). Não existem diferenças significativas entre o peso por nódulo de plantas inoculadas com a estirpe “wild type” e transformada.

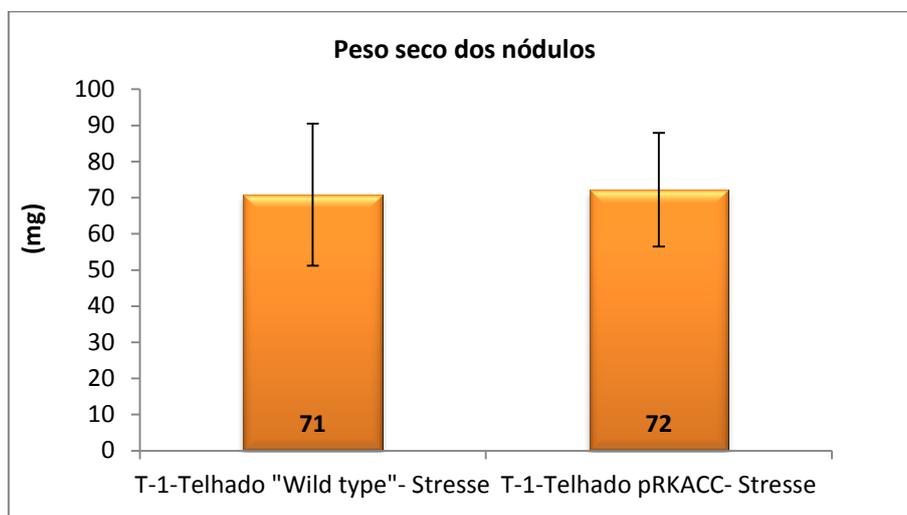


Gráfico 12- Peso seco dos nódulos formados nos diferentes tratamentos na condição de stresse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

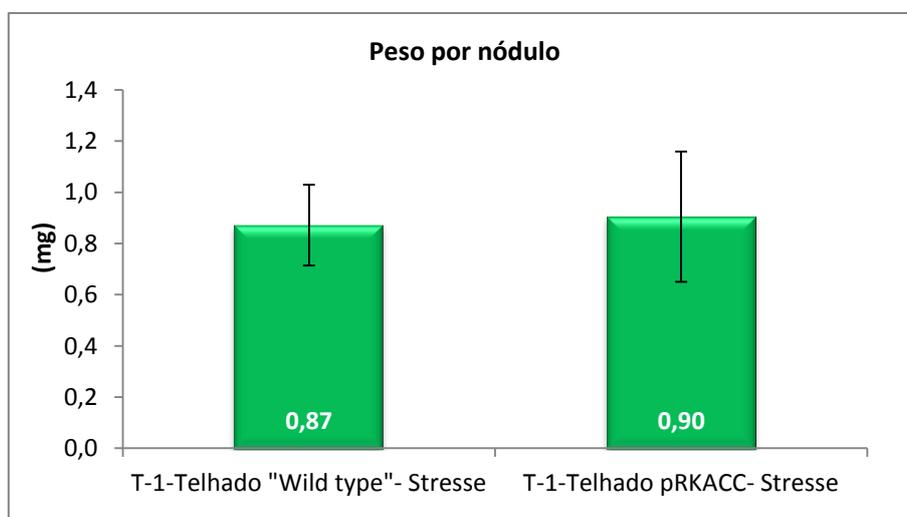


Gráfico 13- Peso por nódulo nos diferentes tratamentos na condição de stresse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Na análise temporal, não são observadas diferenças significativas entre os dois tratamentos (**Gráfico 14**). Este resultado sugere que em condições de stresse a presença de um gene *acdS* exógeno não traz vantagens significativas a nível do desenvolvimento dos nódulos. Contudo, é possível que este traga vantagens no período de recuperação

após encharcamento. Seria necessária uma análise temporal mais longa, a fim de se verificar a capacidade de recuperação de ambas as estirpes e a possível influência do gene *acdS* exógeno nessa recuperação.

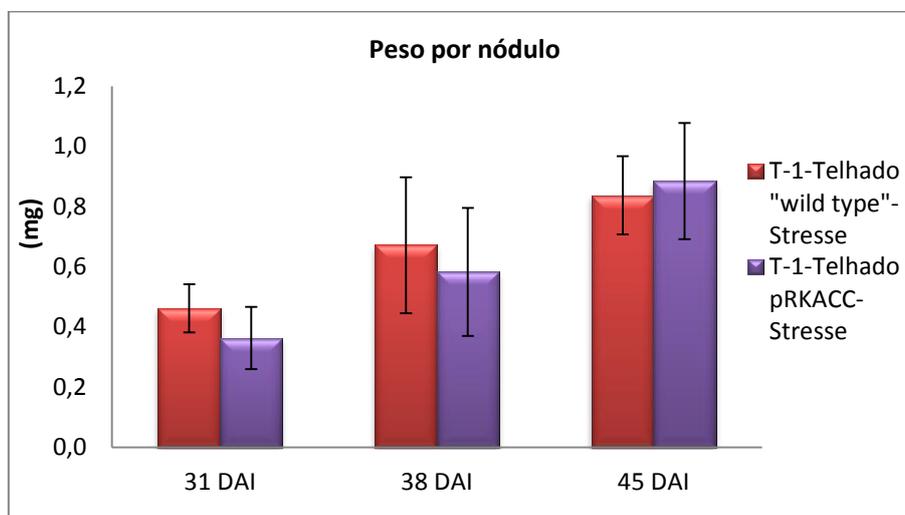


Gráfico 14 - Peso por nódulo de cada tratamento ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-), em condições de stresse. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

7.3 Actividade do complexo enzimático nitrogenase

A actividade específica do complexo enzimático nitrogenase é semelhante nos dois tratamentos (**Gráfico 15**).

Este resultado está de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em condições normais. A presença de um gene *acdS* exógeno não influencia a actividade da enzima nitrogenase (Ma *et al.*, 2003^a).

Através da análise temporal da actividade da nitrogenase (**Tabela 7**) verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos.

Porém, é observada uma maior recuperação da actividade da nitrogenase na estirpe transformada. Possivelmente, ao conseguir degradar o ACC dentro dos nódulos numa maior proporção que a estirpe “wild type”, a estirpe transformada conseguirá obter fontes de energia extra permitindo-lhe uma maior multiplicação (maior número de bacteróides) e consequentemente uma maior actividade da nitrogenase.

Contudo, esta actividade da nitrogenase poderá não se reflectir na fixação de azoto. O processo pelo qual foi medida a actividade do complexo enzimático

nitrogenase (redução de acetileno a etileno) não é o mesmo pelo qual ocorre a fixação de azoto. A informação da redução de acetileno a etileno não pode ser traduzida em fixação de azoto devido ao desacordo na estequiometria dos dois processos (Somasegaran e Hoben, 1994). Logo, apesar da estirpe transformada possuir uma maior recuperação da actividade da nitrogenase esta poderá não se traduzir em quantidade de azoto fixado.

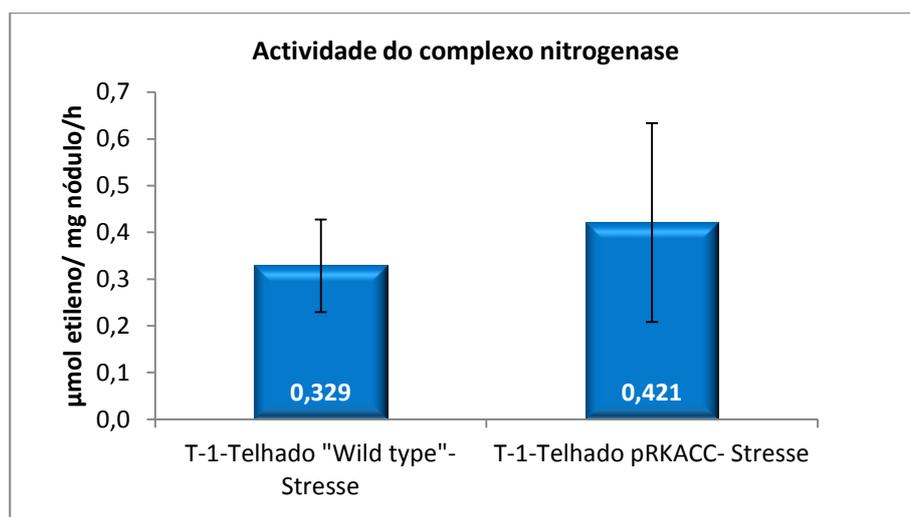


Gráfico 15- Actividade do complexo enzimático nitrogenase por peso de nódulo em plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Tabela 7- Actividade específica do complexo enzimático nitrogenase nos diversos tratamentos ao longo de 3 tempos de colheita (31, 38 e 45 dias após inoculação -DAI-) e em condições de stresse. Neste ensaio foram analisadas 4 réplicas de cada tratamento.

Tratamento	DAI	Etileno produzido (μmol)	Peso por nódulo (mg)	Actividade do complexo enzimático nitrogenase (nmol etileno/ mg nódulo/h)
T-1-Telhado “wild type”-Stresse	31	3,6	25,9	117,4 ± 58,7
	38	25,1	36,1	578,9 ± 289,5
	45	24,3	63,0	370,7 ± 71,8
T-1-Telhado pRKACC-Stresse	31	0,8	20,6	24,8 ± 37,2
	38	33,9	32,6	1004 ± 141,4
	45	29,3	74,4	372,2 ± 185,5

7.4 Biomassa total

Através da visualização do **gráfico 16**, observa-se que plantas inoculadas com a estirpe transformada possuem uma biomassa total semelhante ao das plantas inoculadas com a estirpe “wild type”. Em condições de stresse a presença de uma estirpe transformada com o gene *acdS* não influencia de forma significativa o crescimento da planta de grão-de-bico (ao fim de 45 dias).

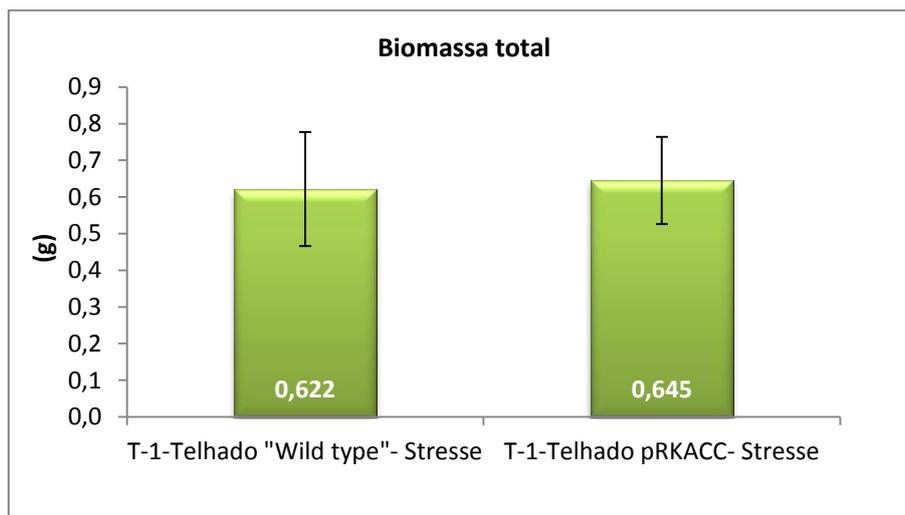


Gráfico 16- Biomassa total de plantas inoculadas com a estirpe “wild type” ou transformada, em condições de stresse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento. No gráfico são apresentadas as barras de desvio padrão.

Contudo, com base nos resultados obtidos em condições normais, é bastante provável que a recuperação seja mais eficiente em plantas inoculadas com a estirpe transformada. Seria necessário um estudo com um espaço temporal mais alargado para assim poder verificar e confirmar o impacto da estirpe transformada com um gene *acdS* exógeno capaz de ser utilizado em condições de vida livre.

7.5 Efeito do encharcamento no desenvolvimento da planta

Verificou-se que o encharcamento afecta diversos parâmetros quantificados na relação simbiótica. A biomassa total da planta assim como o peso dos nódulos formados pela bactéria simbiote são bastante inferiores aos obtidos em condições normais (**Tabela 8**).

Estes resultados estão de acordo com o esperado, visto que é conhecido o efeito deletério do encharcamento no desenvolvimento de plantas leguminosas. Em condições

de encharcamento os processos de desenvolvimento da planta são afectados levando a modificações na relação simbiótica.

Tabela 8- Peso por nódulo e biomassa total de planta de grão-de-bico em condições normais e stresse, 45 dias após inoculação. Neste ensaio foram analisadas 9 réplicas de cada tratamento.

Inoculação	Condição	Peso por nódulo (mg)	Biomassa total (g)
T-1-Telhado "Wild type"	Stresse	0,87 ± 0,16	0,622 ± 0,15
	Normal	2,84 ± 0,79	1,203 ± 0,72
T-1-Telhado pRKACC	Stresse	0,9 ± 0,25	0,645 ± 0,12
	Normal	2,72 ± 0,5	2,086 ± 0,53

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Cowie *et al.*, (1996^a) nos quais é verificada a influência negativa dos efeitos do encharcamento no desenvolvimento da planta de grão-de-bico.

Até há data não existem quaisquer registos bibliográficos de estudos específicos sobre os efeitos do encharcamento na relação simbiótica entre *Mesorhizobium* e grão-de-bico, sendo que este trabalho poderá trazer novas perspectivas futuras e possíveis estudos mais detalhados.

Conclusões

Este estudo demonstra a elevada prevalência do gene *acdS*, codificando a enzima ACC desaminase na população nativa de *Mesorhizobium* de grão-de-bico. O gene *acdS* foi detectado, pelo método de PCR, em 11 dos 56 isolados estudados. Contudo, através da utilização do método de Southern são encontradas mais 8 estirpes possuídas do gene *acdS*, entre elas os isolados T-1 Telhado, PMI-1-Portimão, PMI-6-Portimão, S-8-Sintra, S-15-Sintra e a estirpe tipo *Mesorhizobium ciceri* utilizadas no processo de transformação. O gene *acdS* foi também detectado nas estirpes “tipo” *Mesorhizobium amorphae* e *Mesorhizobium mediterraneum*. Este resultado demonstra que o método de PCR é de certo modo limitado e que será necessária uma nova abordagem na detecção de genes *acdS* em estirpes de *Mesorhizobium*, através da utilização de técnicas como a hibridação de Southern.

Os resultados obtidos neste trabalho vêm contrariar os resultados obtidos no estudo efectuado por Ma *et al.*, (2003^b) onde não foi detectada a presença de qualquer gene *acdS* na estirpe *Mesorhizobium ciceri*. Uma das possíveis causas para esta discrepância entre resultados poderá residir na sonda utilizada e condições do método de hibridação de Southern. No estudo efectuado por Ma *et al.*, (2003^b) foi utilizada uma sonda baseada no gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4. Neste trabalho foi utilizada uma sonda baseada no gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099.

Através do método de hibridação de Southern, verifica-se que todas as estirpes possuídas do gene *acdS* apenas possuem uma cópia do mesmo.

Os genes *acdS* encontrados são bastante similares ao gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. Porém, apesar da elevada semelhança, parecem existir dois conjuntos de genes *acdS* distintos na população nativa de *Mesorhizobium*: o gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (que após digestão com *BamHI* se encontra num fragmento com cerca de 6 Kb) e o gene *acdS* de *Mesorhizobium ciceri* (que após digestão com *BamHI* se encontra num fragmento com cerca de 7,5 Kb). Ambos os genes não são expressos em condições de vida livre como foi verificado através da medição da actividade enzimática da ACC desaminase

Serão necessários mais estudos a fim de se obter a sequência destes novos genes *acdS* para posterior comparação com os genes *acdS* descritos na literatura.

Através da análise filogenética dos 11 genes *acdS* detectados pelo método de PCR, verifica-se que estes são idênticos ao gene *acdS* de *Mesorhizobium loti* MAFF303099. No entanto, após comparação do dendograma baseado na sequência dos genes *acdS* com a árvore filogenética baseada na sequência do 16S rDNA observa-se que, apesar das estirpes possuírem um gene *acdS* semelhante, estas não pertencem à mesma espécie. Este resultado vem demonstrar a possibilidade de aquisição do gene *acdS*, assim como as suas regiões reguladoras, por transferência horizontal de genes.

Este é o primeiro registo da presença do gene *acdS* em estirpes pertencentes à espécie *Mesorhizobium tianshanense*, *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium huakui* e *Mesorhizobium mediterraneum*.

Neste trabalho são obtidas estirpes de *Mesorhizobium* transformadas com o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 capazes de produzir a enzima ACC desaminase em condições de vida livre. Este estudo vem demonstrar que a utilização do método de conjugação triparental para transformação de estirpes de *Mesorhizobium* é possível, abrindo novas perspectivas para futuras transformações com outros genes de interesse.

A transformação de estirpes de *Mesorhizobium* de grão-de-bico com o gene *acdS* de *Pseudomonas putida* UW4 mostra-se uma ferramenta de sucesso e de importante valor pois permite melhorar o desempenho destas estirpes e aumentar a sua capacidade de nodular a planta de grão-de-bico. Em condições normais, plantas inoculadas com a estirpe T-1-Telhado pRKACC apresentam um maior crescimento e desenvolvimento quando comparadas com plantas inoculadas com a estirpe T-1-Telhado “wild type”.

Em condições normais, a estirpe T-1-Telhado ao expressar um gene *acdS* exógeno, aumenta a sua capacidade de nodular a planta de grão-de-bico em cerca de 100%, duplicando o número de nódulos formados e demonstrando assim o importante papel da enzima ACC desaminase na nodulação de plantas leguminosas. No entanto, verifica-se que a enzima ACC desaminase não está directamente relacionada com a actividade do complexo enzimático nitrogenase responsável pela fixação de azoto.

Ao aumentar a sua capacidade de nodulação a estirpe T-1-Telhado pRKACC permite um aumento do crescimento da planta de grão-de-bico em cerca de 74% (em comparação com plantas inoculadas com a estirpe “wild type”).

Em condições de encharcamento a utilização de estirpes de *Mesorhizobium* transformadas com o gene *acdS* parece não trazer qualquer vantagem significativa. Não existem diferenças no crescimento e recuperação de plantas inoculadas com a estirpe transformada em comparação com plantas inoculadas com a estirpe “wild type”.

O factor stresse parece desencadear fenómenos que poderão modificar o processo de nodulação, podendo este deixar de estar sob o controlo da fitohormona etileno. Se assim for, a estirpe transformada deixa de possuir qualquer vantagem em relação à estirpe “wild type”. Contudo, serão necessários mais estudos para verificar o papel da ACC desaminase na recuperação de plantas após stresse intenso.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que em condições de stresse outros processos de regulação da formação de nódulos poderão ser activados e que estes poderão ser independentes do etileno. Este estudo poderá trazer uma nova abordagem ao processo de regulação da nodulação efectuado pela planta e às possíveis implicações de outros agentes até agora desconhecidos.

Este trabalho também demonstra os efeitos deletérios do encharcamento no desenvolvimento da planta de grão-de-bico e consequente relação simbiótica.

Perspectivas futuras

Este trabalho vem permitir uma nova abordagem tanto na detecção de novos genes *acdS* como na importância da ACC desaminase no processo de nodulação.

Alguns dos estudos que poderão ser realizados:

- Sequenciação dos novos genes *acdS* detectados neste trabalho
- Detecção dos novos genes *acdS* em mais isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico
- Conhecimento das regiões reguladoras dos novos genes *acdS*
- Desenvolvimento de metodologias para a medição da actividade da ACC desaminase nos nódulos
- Verificar a competitividade de estirpes transformadas com pRKACC
- Verificar o papel da ACC desaminase nas várias fases do processo de nodulação
- Utilização das estirpes transformadas em estudos gnotobióticos com outras condições de stresse (temperatura, presença de metais pesados, entre outros)

Alguns dos resultados obtidos neste trabalho sugerem que outros mecanismos de autoregulação de formação de nódulos podem ser activados durante o stresse, tornando-se importante conhecer e esclarecer alguns processos, nomeadamente:

- O envolvimento da via dos nitratos na nodulação da planta de grão-de-bico
- O papel das auxinas na nodulação em condições de encharcamento
- Mecanismos de autoregulação da formação de nódulos na planta de grão-de-bico

Bibliografia

- Abeles, F., Morgan, P. Saltveit Jr., M. (1992). Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S., Oliveira, S. (2009). Survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. *Microbial Ecology*. 58: 930-941.
- Amrhein, N., Schneebeck, D., Skoripka, H., Tophof, S., Stockigt, J. (1981). Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften*. 68: 619-620.
- Babalola, O., Osir, E., Sanni, A., Odhaimbo, G., Bulimo, W. (2003). Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. *African Journal of Biotechnology*. 2: 157-160.
- Belimov, A., Hontzeas, N., Safronova, V., Demchinskaya, S., Piluzza, G., Bullitta, S., Glick, B. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 241-250.
- Belimov, A., Safronova, V., Sergeyeva, T., Egorova, T., Matveyeva, V., Tsyganov, V., Borisov, A., Tikhonovich, I., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K., Stepanok, V. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 642-652.
- Bertolla, F., Simonet, P. (1999). Horizontal gene transfer in the environment: natural transformation as a potential process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* 150: 375-384.
- Black, J. (1996). Microbiology- Principles & applications. 3rd edition. Ed. Prentice Hall. Upper saddle river, New Jersey.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M. S., Moenne-Loccoz, Y. (2006). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*. 56: 455-470.
- Boucher, Y., Douady, C., Papke, R., Walsh, D., Boudreau, M., Nesbo, C., Case, R., Doolittle, W. (2003) Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu. Rev. Genet.* 37: 283-328.
- Bradford, K., Yang, S., (1980). Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol.* 65: 322-326.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brígido, C., Alexandre, A., Laranjo, M., Oliveira, S. (2007). Moderately acidophilic mesorhizobia isolated from chickpea. *Lett Appl Microbiol.* 44:168-174
- Broughton, W., Dilworth, M., (1971). Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. *Biochemical Journal.* 125: 1075-1080.

- Brown, M., (1974). Seed and root bacterization. *Annal Review of Phytopathology* 12: 181-197.
- Burd, G., Dixon, D., Glick, B., (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3663–3668.
- Burris, R., (1994). Biological nitrogen fixation—past and future, p. 1–11. In N. A. Hegazi, M. Fayez, and M. Monib (ed.), Nitrogen fixation with nonlegumes. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt
- Caba, J., Recalde, L., Ligeró, F., (1998). Nitrate-induced ethylene biosynthesis and the control of nodulation in alfalfa. *Plant, Cell & Environment*. 21: 87–93.
- Caetano-Anolles, G., Gresshoff, M., (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology*. 45: 345-382.
- Callaham, D., Torrey, J., (1981). The Structural Basis for Infection of Root Hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany*. 59: 1647 – 1664.
- Campbell, B., Thomson, J., (1996). 1-Aminocyclopropane- 1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 138: 207-210.
- Chen, W., Yan, G., Li, J., (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal That *Rhizobium fredii* be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 392-397.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a Moderately and Slowly Growing Root-Nodule Bacterium Isolated from an Arid Saline Environment in Xinjiang, Peoples-Republic-of-China. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:153-159.
- Chen, W., Li, G., Qi, Y., Wang, E., Yuan, H., Li, J. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the Root-Nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 275-280.
- Ciardi, J., Tieman, D., Lund, S., Jones, J., Stall, R., Klee, H., (2000). Response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology*. 123: 81–92.
- Cowie, A., Jessop, R., MacLeod, D., (1996 a). Effects of waterlogging on chickpeas. I. Influence of timing of waterlogging. *Plant and Soil*. 183: 97-103.
- Cowie, A., Jessop, R., MacLeod, D., (1996 b). Effects of waterlogging on chickpeas. II. Possible causes of increased sensitivity to waterlogging at flowering. *Plant and Soil*. 183: 105-115.
- Crozier, Y. Kamiya, G. Bishop, T., Tokota, Y. (2000). Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, in: B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 850–929.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M., Lindström, K., Dreyfus, B., Gillis, M. (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 369-382.

- De Rijke, E., Aardenburg, L., Van Dijk, J., Ariese, F., Ernst, W., Goojier, C., Brinkman, U. (2005) Changed isoflavone levels in Red Clover (*Trifolium pratense* L.) leaves with disturbed root nodulation in response to waterlogging. *Journal of Chemical Ecology*. 31: 1285-1298
- Dey, R., Pal, K., Bhatt, D., Chauhan, S. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 159: 371–394.
- Dilworth, M. (1966). Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta*. 127: 285-294.
- Dreyfus, B., Garcia, J., Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen nov, sp nov, a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 89-98.
- Duan, J., Muller, K., Charles, T., Vesely, S., Glick, B. (2006). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia: Isolation, characterization and regulation. Proceedings of the 7th International PGPR Workshop (50 pp). Amsterdam.
- Duan, J., Müller, K., Charles, T., Vesely, S., Glick, B. (2008). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in *Rhizobia* from southern Saskatchewan. *Microb. Ecol.* 57: 423-436.
- Duarte, I., De Sousa, M., Pereira, M., Carita, T. (1992). Duas novas cultivares de grão-de-bico para sementeira antecipada de Outono: ELMO e ELVAR. *Pastagens e Forragens*. 13:125-134.
- Elkan, G., Bunn, C., (1994). The Rhizobia. In *The Prokaryotes*, pp. 2197-2213. Edited by A. Ballows & e. al. Berlin: Springer-Verlag.
- Else, M., Jackson, M., (1998). Transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in the transpiration stream of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in relation to foliar ethylene production and petiole epinasty. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 453–458.
- Etherington, J., (1983). *Wetland Ecology*. Edward Arnold Publishers, London.
- Fallik, E., Sarig, S., Okon, Y. (1994). Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: Okon Y (ed) *Azospirillum/ plant associations*. CRC Press, London, pp 77–86.
- Fearn, J., La Rue, T., (1991). Ethylene inhibitors restore nodulation of *sym 5* mutants of *Pisum sativum* cv. “Sparkle”. *Plant Physiol.* 144: 633-640.
- Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, E., Gresshoff, P. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52: 61–76.
- Fisher, R., Tu, J., Long, S. (1985). Conserved Nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 49: 1432 – 1435.
- Francis, C., Devvitt, A., (1969). The effect of waterlogging on the growth and isoflavone concentration of *Trifolium subterraneum*. *L. Aust. J. Agric. Res.* 20: 819-825.
- Francoise, M., Schmidt, E. (1982). Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 661-667.

- Frankenberger, W., Arshad, M., (1995). *Phytohormones in Soil*. Marcel Dekker, New York.
- Gage, D., (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 280-300.
- Gagnon, H., Ibrahim, R., (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 44: 1463-1467.
- Gallacher, A., Sprent, J. (1978). The Effect of Different Water Regimes on Growth and Nodule Development of Greenhouse-Grown *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 29(2): 413-423
- Gao, J., Turner, S., Kan, F., Wang, E., Tan, Z., Qiu, Y., Gu, J., Terefework, Z., Young, J., Lindström, K., Chen, W. (2004). *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2003-2012.
- Ghosh, S., Penterman, J., Little, R., Chavez, R., Glick, B., (2003). Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the growth of canola seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 277–281.
- Giovanelli, J., Mudd, S., Datko, A. (1980). Sulfur amino acids in plant. In: *Amino Acids and Derivatives. The Biochemistry of Plants: A comprehensive Treatise*. Vol 5 (Mifflin BJ ed). Academic Press, New York, USA: 453-505.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.-S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., Sadowsky, M., (2007). Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. 316: 1307-1312.
- Glick, B. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109-117.
- Glick, B., Karaturovic, D., Newell, P., (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 533-536.
- Glick, B., Liu, C., Ghosh, S., Dumbroff, E. (1997). Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1233-1239.
- Glick, B., Penrose, D., Li, J., (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 190: 63-68.
- Glick, B. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 1-7.
- Glick, B., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 329-339.
- Glinsk, J., Stepniowski, W. (1986). *Soil aeration and its role for plants*. CRC Press Inc, Florida. 228 p.

- Goodlass, G., Smith, K., (1979). Effect of ethylene on root extension and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant and Soil*. 51: 387-395.
- Grichko, V., Glick, B., (2000). Identification of DNA sequences that regulate the expression of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene. *Canadian Journal of Microbiology*. 46: 1159-1165.
- Guinel, F., Geil, R., (2002). A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian Journal of Botany*. 80: 695-720.
- Guinel, F., LaRue, T., (1992). Ethylene inhibitors partly restore nodulation to pea mutant E107 (*brz*). *Plant Physiology*. 99: 515-518.
- Guinel, F., Sloetjes, L., (2000). Ethylene is involved in the nodulation phenotype of *Pisum sativum* R50 (sym 16). An pleiotropic mutant that nodulated poorly and has pale green leaves. *Journal of Experimental Botany*. 51: 885-894.
- Hall, J., Peirson, D., Ghosh, S., Glick, B., (1996). Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Plant Sci*. 44: 37-42.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hirsch, A., Bhuvanewari, T., Torrey, J., Bisseling, T., (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 1244-1248.
- Hirsch, A., Fang, Y., (1994). Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Molecular Biology*. 26: 5-9.
- Holguin, G., Glick, B. (2001). Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecology*. 41: 281-288.
- Holguin, G., Glick, B., (2003). Transformation of *Azospirillum brasilense* Cd with an ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 fused to the *Tetr* gene promoter improves its fitness and plant growth promoting ability. *Microbial Ecology*. 46: 122-133.
- Hong, Y., Glick, B., Pasternak, J., (1991). Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Curr Microbiol*. 23:111-114
- Honma, M., Shimomura, T., (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. 42: 1825-1831.
- Honma, M., (1985). Chemically reactive sulfhydryl groups of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 567-571.
- Honma, M., (1993). Stereospecific reaction of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate deaminase. In J. C. Pech, A. Latche´, & C. Balague´ (Eds.), Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene (pp. 111-116). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers

- Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B., Abu-Omar, M., (2004). Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochimica Biophysica Acta*. 1703: 11-19.
- Hontzeas, N., Richardson, A., Belimov, A., Safranov, V., Abu-Omar, M., Glick, B., (2005). Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 7556–7558.
- Hyodo, H., (1991). Stress/wound ethylene. In A. K. Mattoo, & J. C. Shuttle (Eds.), *The plant hormone ethylene* (pp. 65– 80). Boca Raton: CRC Press. Inoculants. Plant Management Network.
- Itoh, T., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Kasai, H., Kimura, S., Kitakawa, M., Kitagawa, M., (1996). A 460-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 40.1-50.0 min region on the linkage map (Supplement). *DNA Research*. 3: 441-445.
- Jacobson, C., Pasternak, J., Glick, B., (1994). Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 1019-1025.
- Janczarek, M., Urbanik-Sypniewska, T., Skorupska, A., (1997). Effect of authentic flavonoids and the exudate of clover roots on growth rate and inducing ability of nod genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiol. Res.* 152:93-98.
- Jarvis, B., van Berkum, P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Cleyet-Marel, J., Gillis, M., (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 895-898.
- Jia, Y., Kakuta, Y., Sugawara, M., Igarashi, T., Oki, N., Kisaki, M., Shoji, T., Kanetuna, Y., Horita, T., Matsui, H., (1999). Synthesis and degradation of 1 aminocyclopropane-1- carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63(3): 542-549.
- John, P., (1991). How plant molecular biologists revealed a surprising relationship between two enzymes, which took an enzyme out of a membrane where it was not located, and put it into the soluble phase where it could be studied. *Plant Molecular Biology Reporter*. 9: 192-194.
- Jordan, D., (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32: 136-139.
- Jordan, D., (1984). Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 234-256. Edited by J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S., (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research* 7: 331-338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. and Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*. 9: 189–197.

- Kay, E., Chabrilat, G., Vogel, T., Simonet, P., (2003). Intergeneric transfer of chromosomal and conjugative plasmid genes between *Ralstonia solanacearum* and *Acinetobacter* sp. and its natural competence development. *Microbiol.Ecol.* 43: 291-297.
- Kende, H., (1989). Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology.* 91: 1-4.
- Kende, H., (1993). Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283–307
- Kimura, M., (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16: 111-120.
- Kinkema, M., Scott, P., Gresshoff, P. (2006) Legume nodulation: successful symbiosis through short- and long-distance signaling. *Functional Plant Biology.* 33: 707–721.
- Klee, H., Kishore, G., (1992). Control of fruit ripening and senescence in plants. International Patent No. WO 92/12249. European Patent Office, World Intellectual Property Organization.
- Klee, H., Hayford, M., Kretzmer, K., Barry, G., Kishore, G., (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell.* 3: 1187–1193.
- Kloepper, J., Lifshitz, R., Zablutowicz, R., (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology.* 7: 39-43.
- Kloepper, J., Schroth, M., (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proc. Of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter. Gilbert-Clarey, Tours, France. Vol. 2,pp: 879-882.
- Kucey, R., Hynes, M., (1989). Populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *viciae* in fields of bean and pea in rotation with nonlegumes. *Canadian Journal of Microbiology.* 35: 661-667.
- Laranjo, M., Rodrigues, R., Alho, L., Oliveira, S. (2001). Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 90: 662-667.
- Laranjo, M., Machado, J., Young, J., Oliveira, S. (2004). High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiology Ecology.* 48 (1):101-107
- Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velázquez, E., Young, J., Oliveira, S. (2008). Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiol Ecology.* 66:391–400
- Lee, K., LaRue, T., (1992). Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiology.* 100: 1759-1763.
- Lee, K., De Backer, P., Aono, T., Liu, C., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D., Najjar, F., Wiley, G., Roe, B., Binnewies, T., Ussery, D., D'Haese, W., Herder, J., Gevers, D., Vereecke, D., Holsters, M., Oyaizu, H. (2008). The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS 571. *BMC Genomics.* 9: 271.
- Leonard, P., Smits, S., Sedelnikova, S., Brinkman, A., de Vos, W., van der Oost, J., Rice, D., Rafferty, J., (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO Journal.* 20: 990–997.

- Li, J., Glick, B. (2001). Transcriptional regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene (*acdS*). *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 259-267.
- Ligero, F., Caba, J., Lluch, C., Olivares, J. (1991) Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiology*. 97: 1221–1225.
- Ligero, F., Lluch, C., Olivares, J. (1986). Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. *J. Plant Physiol.* 125: 361–365.
- Lynch, J., Whipps, J. (1991). Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister DL, Cregan PB (eds) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 15-24.
- Ma, W., Charles, T., Glick, B. (2004). Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5891-5897.
- Ma, W., Guinel, F., Glick, B. (2003a). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ACC deaminase protein promotes the nodulation of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4396–4402.
- Ma, W., Sebastianova, S., Sebastian, J., Burd, G., Guinel, F., Glick, B. (2003b). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83, 285–291.
- Maças, I.M.V.D (1994). Seleção morfológica e fisiológica para a resistência à seca em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Tese de mestrado. Universidade técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J., Sa, T. (2006). Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase containing *Methylobacterium fjisawaense*. *Planta*. 224, 268–278.
- Martínez-Abarca, F., Garcia-Rodriguez, F., Toro, N. (2000). Homing of a bacterial group II intron with an intron-encoded protein lacking a recognizable endonuclease domain. *Mol. Microbiol.* 35: 1405–1412.
- Mathesius, U., Bayliss, C., Weinman, J., Schlaman, H., Spaink, H., Rolfe, B., McCully, M., Djordjevic, M. (1998) Flavonoids synthesized in cortical cells during nodule initiation are early developmental markers in white clover. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 11: 1223–1232.
- Mattoo, A., Suttle, J. (1991). *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. (2004). Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Science*. 166: 525–530.
- McKeon, T., Fernández-Maculet, J., Yang, S. (1995) Biosynthesis and metabolism of ethylene. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., P. J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 118–139.
- Mercier, A., Kay, E., Simonet, P. (2006). Horizontal gene transfer by natural transformation in soil environment. In Nannipieri P and Smalla K (ed.), *Nucleic Acids and Proteins in Soils*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 355-373.
- Miller, J. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p 431.

- Minami, R., Uchiyama, K., Murakami, T., Kawai, J., Mikami, K., Yamada, T., Yokoi, D., Ito, H., Matsui, H., Honma, M. (1998). Properties, sequence, and synthesis in *Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *Journal of Biochemistry*. 123: 1112–1118.
- Minchin, F., Pate, J. (1975). Effect of water aeration and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume-definition of an optimum root environment. *Journal of Experimental Botany*. 26: 60–69.
- Miyazaki, J., Yang, S., (1987a). Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiol*. 84: 277–281.
- Miyazaki, J., Yang, S., (1987b). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant*. 69: 366–370.
- Nandwal, A., Godara, M., Sheokand, S., Kamboj, D., Kundu, B., Kuhad, M., Kumar, B., Sharma, S. (2000). Salinity induced changes in plant water status, nodule functioning and ionic distribution in phenotypically differing genotype of *Vigna radiata* L. - *J. Plant Physiol*. 156: 352-359.
- Nelson, L. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. [online]. Crop Management.
- Newton, W. (2000). Nitrogen fixation in perspective. In Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity., F. O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates & W. E. Newton(Eds)Kluwer Publishers. Dordrecht, Netherlands p. 3-8
- Nour, S., Fernandez, M., Normand, P., Cleyet-Marel, J-C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol*. 44:511-522.
- Nour, S. , Cleyet-Marel, J., Normand, P. , Fernandez, M. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 640-648.
- Nukui, N., Minamisawa, K., Ayabe, S., Aoki, T. (2006). Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene nifA2 in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4964-4969.
- O'Donnell, P., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H., Bowles, D. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*. 274: 1914–1917.
- Oldroyd, G., Engstrom, E., Long, S. (2001). Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 13: 1835-1849.
- Oldroyd, G., Downie, J. (2004). Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 5: 566-576
- Olsson, L., Veit, M., Weissenbo, C., Bornman, J. (1998). Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*. 49:1021-1028.
- Pacios-Bras, C., Schlaman, H., Boot, K., Admiraal, P., Langerak, J., Stougaard, J., Spaink, H. (2003). Auxin distribution in *Lotus japonicas* during root nodule development. *Plant Molecular Biology*. 52: 1169–1180.
- Pelzcar, M., Chan E., Krieg, N (1993). Microbiology. Ed. McGraw-Hill.

- Penmetsa, R., Cook, D. (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*. 275: 527-530.
- Penninckx, I., Thomma, B., Buchala, A., Metraux, J., Broekaert, W. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 2103–2113.
- Penrose, D., Glick, B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant*. 118: 10-15.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180-201.
- Peters, N., Crist-Estes, D. (1989). Nodule formation is stimulated by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiology*. 91: 690-693.
- Pezeszki, S. (1994). Plant responses to flooding. In: Wilkinson, R.E. (ed.) *Plant– Environment Interactions*. Marcel Dekker, New York, pp. 289–323
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E., Voeseek, L. (2006). The Janus face of ethylene: Growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*. 11: 176–183.
- Redmond, J., Batley, M., Djordjevic, M., Innes, R., Kuempel, P., Rolfe, B. (1986). Flavones Induce Expression of Nodulation Genes in *Rhizobium*. *Nature*. 323: 632–635.
- Reuber, S., Bornman, J., and Weissenbo, C. (1996). Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiol. Plant*. 97:160-168.
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P., Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*. 22: 1086-1089.
- Robison, M., Griffith, M., Pauls, K., Glick, B. (2001). Dual role of ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology*. 149: 385– 388.
- Rodrigues, T., Rodrigues, L., Reis, R. (1993). Adaptação de plantas forrageiras às condições adversas. In: Simpósio Sobreecossistema de Pastagens, 2., Jaboticabal, 1993. *Anais... Jaboticabal*: FUNEP, p.17-61.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J., Rothenberg, M., Ecker, J., (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*. **139**: 1393-1409
- Rossen, L., Davis, E., Johnston, A. (1987). Plant-induced expression of *Rhizobium* genes involved in host specificity and early stages of nodulation. *Trends Biochem. Sci*. 12: 430-433.
- Sadowsky, M., Graham, P. (2000). Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*,. Edited by M.Dworkin. New York: Springer-Verlag.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Saxena, M., Singh, K. (1987). *The Chickpea*. Wallingford, UK: CAB International.
- Schmidt, J., Harper, J., Hoffman, T., Bent, A. (1999). Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. *Plant Physiology*. 119: 951–959.
- Shah, S., Li, J., Moffat, B., Glick, B. (1998). Isolation and Characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 833-843.
- Sheehy, R., Honma, M., Yamada, M., Sasaki, T., Martineau, B., Hiatt, W. (1991). Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the Pseudomonas sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Bacteriology*. 173; 5260–5265.
- Siddique, K. (2000). Understanding growth stresses of cool season pulses. In: O’Connell, L. (ed.) *Shared Solutions Cropping Manual*, Australian Grain. Berekua, Brisbane, pp. 12–16.
- Silva, A. (1986). Tolerância das plantas ao encharcamento. In: Simpósio sobre alternativas ao sistema tradicional de utilização das várzeas do Rio Grande do Sul, 1., *Anais...* Brasília: p.166-181.
- Smit, G., Tubbing, D., Kijne, J., Lugtenberg, B. (1991). Role of Ca²⁺ in the activity of ricadhesin from *Rhizobium leguminosarum* bv viciae, which mediates the first step in attachment of rhizobiaceae cells to plant root-hair tips. *Archives of Microbiology*. 155: 278-283
- Somasegaran, P., Hoben, H. (1994). *Handbook for Rhizobia*. New York: Springer-Verlag.
- Sousa, M., Duarte, I. (1990) *Ascochyta rabiei* em grão-de-bico. Estratégia de melhoramento. *Pastagens e forragens*. 11:179-189.
- Spaink, H. (1997). Ethylene as a regulator of *Rhizobium* infection. *Trends in Plant Science*. 2: 203- 204.
- Sprent, J. (1969). Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. *Planta*. 88: 372-375.
- Sprent, J. (1971). The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. *New Phytol.* 70: 9-17.
- Sprent, J., Sprent, P. (1990). Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Stafford, H., Ibrahim, R. (1992). Phenolic Metabolism in Plants. Plenum Press, New York.
- Stearns, J., Glick, B. (2003). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*. 21: 193–210.
- Stiens, M., Schneiker, S., Keller, M., Kuhn, S., Puhler, A., Schluter, A. (2006). Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 3662-3672.
- Sullivan, J., Trzebiatowski, J., Cruickshank, R., Guozy, J., Brown, S., Elliot, R., Fleetwood, D., McCallum, N., Rossbach, U., Stuart, G., Weaver, J., Webby R., DeBruijn, F., Ronson, C. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of Bacteriology*. 184: 3086-3095.

- Suominen, L., Luukkainen, R., Roos, C., Lindstrom, K. (2003). Activation of the nodA promoter by the nodD genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudate. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 225-232.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Ethylene: The Gaseous Hormone. Plant Physiology, 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. pp: 571-591.
- Tamimi, S., Timko M. (2003). Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil.* 257: 125-131.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24:1596–1599.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Trott, S., Bauer, R., Knackmuss, H. Stolz, A. (2001). Genetic and biochemical characterization of an enantioselective amidase from *Agrobacterium tumefaciens* strain d3. *Microbiology.* 147: 1815–1824.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M., Minamisawa, K. (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *Journal of Bacteriology.* 186: 2439–2448.
- Uppal, H., Mathauda, S., Mahey, R. (2002). Water management and crop productivity. In: Singh, G., Sekhon, H.S. and Kolar, J.S. (eds) *Recent Advances in Agronomy*. Indian Society of Agronomy, IARI, New Delhi, India, pp. 278–313.
- Van Loon, L., Glick, B. (2004). Increased plant fitness by rhizobacteria. In H. Sandermann (Ed.), *Molecular ecotoxicology of plants* (pp. 177–205). Berlin: Springer- Verlag.
- Van Loon, L., Geraats, B., Linthorst, H. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science.* 11: 184–191.
- Visser, E., Voeselek, L., Vertapetian, B., Jacson, A. (2003). Flooding and plant growth. *Annals of Botany.* 91: 107–109.
- Voet, D., Voet, J. (1995). *Biochemistry*. 2nd edition. John Wiley & sons, Inc., New York.
- Walsh, C., Pascal, R. A., Johnston, M., Raines, R., Dikshit, D., Krantz, A., Honma, M. (1981). Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1- carboxylate from *Pseudomonas* sp. *Biochemistry.* 20: 7509–7519.
- Wang, S., Adams, D., Lieberman, M. (1982). Recycling of 50-methylthioadenosine ribose carbon into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production, *Plant Physiol.* 70: 117–121.
- Weaver, R., Frederick, R. (1974). Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I: Greenhouse studies. *Agronomy Journal.* 66: 229-232.

- Wang, E. , van Berkum, P., Sui, X. , Beyene, D., Chen, W., Martínez-Romero, E. (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 51-65.
- Wisniewski, J., Rathbun, E., Knox, J., Brewin, N. (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 13: 413–420.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F., Jiang Q., Gresshoff, P., de Bruijn, F., Stougaard, J., Szczyglowski, K. (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23:97– 114.
- Wu, C., Dickstein, R., Carry, A., Norris, J. (1996). The auxin transport inhibitor N-(1-Naphthyl)phthalamic acid elicits pseudonodules on non-nodulating mutants of white sweet clover. *Plant Physiology*. 110: 501–510.
- Xi, C., Schoeters, E., van der Leyden, J., Michels, J. (2000). Symbiosis-Specific Expression of *Rhizobium etli* *casA* Encoding a Secreted Calmodulin-Related Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97. 11114 – 11119.
- Yadav, S., Redden, R., Chen, W., Sharma, B. (2007) Chickpea Breeding and Management. Wallingford, UK: CAB International
- Yao, P., Vincent, J. (1969). Host Specificity in the Root Hair "Curling Factor" of *Rhizobium* sp. *Australian Journal of Biological Sciences*. 22: 413 – 423.
- Yang, S, Hoffman, N. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Young, J., Crossman, L., Johnston, A., Thomson, N., Ghazoui, Z., Hull, K., Wexler, M., Curson, A., Todd, J., Poole, P., Mauchline, T., East, A., Quail, M., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., Parkhill, J. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*. 7: R34.
- Zahir, Z., Arshad, M., Frankenberger, W. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy*. 81: 97-168.
- Zahran, H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 968-989.

Anexos

1. Anexo 1

Lista dos isolados de *Mesorhizobium* de grão-de-bico utilizados neste trabalho.

Isolados	Localização	nº de plasmídeos	E.S%	Referência
AL-13	Alenquer	n.d	15	Brígido, C. (resultados não publicados)
AII-5	Aveiro	2	26	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
AII-7	Aveiro	2	32	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
29	Beja	6	71	Laranjo <i>et al.</i> , 2001; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
6b	Beja	2	76	Laranjo <i>et al.</i> , 2001; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
7a	Beja	2	39	Laranjo <i>et al.</i> , 2001; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
BR-15	Bragança	2	21	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
BR-28	Bragança	0	48	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
BR-8	Bragança	2	45	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CR-18	Caldas da Rainha	0	41	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CR-29	Caldas da Rainha	0	55	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CR-3	Caldas da Rainha	0	77	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CR-32	Caldas da Rainha	0	57	Brígido <i>et al.</i> , 2007; Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CB-10	Castelo Branco	0	56	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CB-19	Castelo Branco	0	30	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
CB-38	Castelo Branco	4	61	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-1	Coimbra	1	47	Brígido <i>et al.</i> , 2007; Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-13	Coimbra	1	49	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-14	Coimbra	2	32	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-15	Coimbra	1	20	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-23	Coimbra	1	23	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-24	Coimbra	1	39	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-25	Coimbra	2	21	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-7	Coimbra	1	14	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
C-9	Coimbra	2	20	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
75	Elvas	1	35	Laranjo <i>et al.</i> , 2001; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
EE-7	Elvas	0	84	Laranjo <i>et al.</i> , 2002; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
90	Évora	1	49	Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
94	Évora	1	33	Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
102	Évora	0	54	Laranjo <i>et al.</i> , 2001; Laranjo <i>et al.</i> , 2008;
LM-1	Lamego	1	61	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
L-19	Leiria	0	48	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
PA-5	Portimão	n.d	2	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
PM-1	Portimão	2	51	Alexandre <i>et al.</i> , 2009
PMI-1	Portimão	1	80	Alexandre <i>et al.</i> , 2009

PMI-6	Portimão	1	81	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
PII-1	Porto	3	58	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
PII-2	Porto	2	71	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
STR-10	Santarém	1	28	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
STR-16	Santarém	2	49	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
STR-4	Santarém	1	50	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
SA-13	Serra d'Água-Madeira	0	58	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
SA-17	Serra d'Água-Madeira	3	16	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
SA-9	Serra d'Água-Madeira	0	36	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
ST-5	Setúbal	0	21	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
ST-8	Setúbal	0	7	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
S-1	Sintra	3	53	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
S-15	Sintra	0	79	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
S-24	Sintra	n.d	100	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
S-26	Sintra	0	68	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
S-8	Sintra	1	83	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
T-1	Telhado- Guarda	1	100	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
T-5	Telhado- Guarda	0	56	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
V-15b	Viseu	0	23	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
V-20	Viseu	1	67	Alexandre <i>et al.</i> ,2009
V-25b	Viseu	1	69	Alexandre <i>et al.</i> ,2009

2. Anexo 2

Lista das estirpes “tipo” de *Mesorhizobium* utilizadas neste trabalho.

Espécie	Estirpe	Planta hospedeira	Origem	Referência
<i>M. amorphae</i>	ACCC 19665T	<i>Amorpha fruticosa</i>	China	(Wang <i>et al.</i> , 1999)
<i>M. ciceri</i>	UPM-Ca7T	<i>Cicer arietinum</i>	Espanha	(Nour <i>et al.</i> , 1994)
<i>M. huakuii</i>	CCBAU 2609T	<i>Astragalus sinicus</i>	China	(Chen <i>et al.</i> , 1991)
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca36T	<i>Cicer arietinum</i>	Espanha	(Nour <i>et al.</i> , 1995)
<i>M. plurifarium</i>	ORS 1032T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	(de Lajudie <i>et al.</i> , 1998)
<i>M. septentrionale</i>	HAMBI 2582T	<i>Astragalus adsurgens</i>	China	(Gao <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. tianshanense</i>	A-1BST	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	China	(Chen <i>et al.</i> , 1995)

3. Anexo 3

Números de acesso do gene *acdS* de diversas estirpes bacterianas.

Número de acesso	Estirpe
BA000012.4	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099
AL672114.1	<i>Mesorhizobium loti</i> R7A
AF421376.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
AM236084.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841
AY604534.1	<i>Rhizobium sullae</i> ATCC 43676
CP000494.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1
AP009384.1	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571
AF047840.1	<i>Pseudomonas putida</i> UW4
AY604533.1	<i>Pseudomonas putida</i> Bm3
CP000076.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5
AY604545.1	<i>Pseudomonas syringae</i> GR12-2
AY604539.1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A551
AY604530.1	<i>Variovorax paradoxus</i> 2C1
AY604532.1	<i>Variovorax paradoxus</i> 3C3
BX571966.1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
AY604543.1	<i>Serratia proteoamaculans</i> SUD

4. Anexo 4

Números de acceso do 16S rDNA de diversas estirpes bacterianas

Número de acceso	Estirpe/isolado
NC002678.2	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099
D14514	<i>Mesorhizobium loti</i>
U07934	<i>Mesorhizobium ciceri</i>
AF041442	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
AJ278249	<i>Mesorhizobium chacoense</i>
D12797	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
L38825	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>
Y14158	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>
AF041447	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>
AF508208	<i>Mesorhizobium temperatum</i>
AF508207	<i>Mesorhizobium septentrionale</i>
DQ100066	<i>Mesorhizobium albiziae</i>
AJ864462	<i>Mesorhizobium thioganicum</i>
U28916	<i>Rhizobium etli</i>
U89831	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
X67222	<i>Sinorhizobium medicae</i>
D14509	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
U69638	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
D11342	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
AY559493	<i>Pseudomonas putida</i> UW4