



LUCAS GONTIJO SILVA MAIA

**CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE NO FATOR
DE TRANSCRIÇÃO ZF-GRF DO NÓDULO DE
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DE
*Medicago truncatula***

LAVRAS - MG

2013

LUCAS GONTIJO SILVA MAIA

**CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
ZF-GRF DO NÓDULO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DE
*Medicago truncatula***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Agronomia / Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Celular / Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Vagner Augusto Benedito, PhD.

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Maia, Lucas Gontijo Silva.

Caracterização do mutante no fator de transcrição ZF-GRF do
nódulo de fixação de nitrogênio de *Medicago truncatula* / Lucas
Gontijo Silva Maia. – Lavras : UFLA, 2013.

104 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Vagner Augusto Benedito.

Bibliografia.

1. Nodulação. 2. *Tnt1*. 3. Simbiose. 4. Fixação simbiótica de
nitrogênio. 5. Gene. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.32204873223

LUCAS GONTIJO SILVA MAIA

**CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
ZF-GRF DO NÓDULO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DE
*Medicago truncatula***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Agronomia / Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Celular / Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de julho de 2013.

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Prof. Dr. Antônio Paulino da Costa Netto CAJ/UFG

Prof. Vagner Augusto Benedito, PhD.
Orientador

LAVRAS - MG

2013

A Deus, por me dar força para alcançar os meus objetivos.

OFEREÇO

Aos meus pais, José Carlos e Cleusa, pelo amor e apoio incondicional, por serem pessoas maravilhosas em que eu me espelho e pelos valiosos ensinamentos e exemplo de vida;

Ao meu irmão, Paulo, e sua família, pela querida amizade, carinho, apoio, exemplo e magníficos momentos juntos;

À vovó Aparecida e aos meus falecidos avós, Sô Marra, Zé Gontijo e Lia, pelo amor, carinho e exemplo de vida;

À minha namorada, Dayane, e sua família por todo carinho, exemplo, apoio, confiança e carinho;

Ao falecido irmão, Só-Kanela Iury Rios, pelo exemplo, apoio e amizade...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o mestrado;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação Samuel Roberts Noble, pela disponibilidade do material em estudo;

À WVU e ao Laboratório 2063 - Genômica funcional de plantas da WVU, pela hospitalidade e facilidades para desenvolver esta pesquisa, assim como todo Departamento de Genética e desenvolvimento biológico;

Aos meus padrinhos, Antonino e Dulce, pelo amor, carinho, exemplo de vida e por toda força;

Aos meus tios, Xavier, Tônico, Cláudia e Reinaldo, e primos Tiago, Renato, Gustavo, Rodrigo, Eduardo, por toda força e apoio desde o início dos estudos;

Ao Magno, Ângela e Chalfun, pela credibilidade e direcionamentos;

À Dayane, minha namorada, pelo amor, companheirismo e atenção em todos os momentos, e aos seus pais, Carlos Eugênio e Zeli, por todo o apoio, atenção e momentos de alegria;

Ao meu orientador, Vagner Augusto Benedito, pelos inúmeros ensinamentos, exemplos e pela grande atenção em todas as etapas da minha dissertação.

Ao João Paulo, Túlio, Dayane, Tássia, Ana e demais companheiros de classe, por todo o apoio, amizade e ensinamentos proporcionados desde o início do mestrado;

Ao Horllys, Solange, Lina, Lei, Christina e Roshan, pelos auxílios e companheirismo no laboratório e na WVU;

Aos Amigos; Gabi, Charlie, André, Emilayne, Júnior e demais brasileiros em Morgantown, pelos momentos descontração e alegria, pela grande amizade e conselhos dados;

Aos colegas e amigos; Breno, Camila, Jerônimo, Guilherme, Fernando, Ricardo, Guedes, Lidiane, Carlão, pela amizade e pelos ensinamentos;

Aos irmãos de República Só-Kanela, à querida Neuzinha e República “Veio Chico”, pelos momentos de alegria, apoio, amizade e ensinamentos.

RESUMO

A nodulação de raízes em leguminosas, da infecção à senescência do órgão, é controlada por vários genes. O gene no locus Medtr7g086040 é altamente expresso nos nódulos das raízes da planta *Medicago truncatula* a partir dos quatro dias após a inoculação com rizóbio. A “Samuel Roberts Noble Foundation” desenvolveu várias linhagens mutantes de *Medicago truncatula* com a inserção do retrotransposon *Tnt1* de tabaco. As linhagens NF1858, NF2990 e NF3070 possuem inserção no locus Medtr7g086040. Essas linhagens mutantes foram caracterizadas por genotipagem, localização exata da inserção do retrotransposon no genoma, análise da região promotora, análise filogenética das sequências de proteínas pertencentes à família gênica com domínio Pfam 06839 e fenotipagem da linhagem. Construções genéticas para estudos de complementação dos mutantes foram iniciadas. Conclui-se que o gene tem as características de um fator de transcrição funcional: domínio ZF-GRF conservado e tamanho apropriado para adentrar o núcleo da célula vegetal e promover atividade gênica regulatória. O padrão de expressão do gene Medtr7g086040 é específico e elevado em nódulos de fixação simbiótica de nitrogênio, desde os estádios iniciais de desenvolvimento do nódulo e persiste no nódulo maduro. Isso indica uma função importante, embora não identificada, na simbiose de fixação de nitrogênio. A análise de um dos mutantes insercionais no gene de interesse indica o comprometimento da fixação de nitrogênio, embora não tenha afetado o desenvolvimento do nódulo. Tal padrão é compatível, por exemplo, com uma função envolvida com infecção intracelular pela bactéria ou mesmo com a diferenciação do bacteroide na célula já infectada, embora conclusões sobre a natureza da interação molecular do produto gênico ainda estejam sendo investigadas.

Palavras-chave: Nodulação. *Tnt1*. Simbiose. Gene. Fixação Simbiótica de Nitrogênio.

ABSTRACT

Many genes control the root nodulation in legumes, from infection until the organ senescence. The gene in the locus Medtr7g086040 is highly expressed in root nodules of *Medicago truncatula* plant from four days after the inoculation with *Rhizobium*. The “Samuel Roberts Noble Foundation” developed many mutant lines of *Medicago truncatula* with the retrotransposon *Tnt1* from tobacco. The lines NF1858, NF2990 and NF3070 have this insertion in the locus Medtr7g086040. These mutant lines were characterized by genotyping, exact localization of the insertion in the genome, promoter region analysis, phylogenetic analysis of protein sequence belong the genic family that has the Pfam 06839 domain, and phenotyping. Genetic constructs to complement the mutants in study were started. We conclude that the gene product has the characteristic of a transcription factor: conserved domain ZF-GRF and appropriated size to enter into the cell nucleus and further exert the regulatory gene activity. The gene Medtr7g086040 expression pattern is specific and high in nodule of symbiotic nitrogen fixation, from the beginning of the nodule development and it remains in the mature nodule. This indicates an important function in the symbiosis, although unidentified yet. The analysis of one of the insertion mutants indicates compromise of nitrogen fixation, although it did not disrupt nodule development. This pattern is compared with, for example, a function involved with the intracellular infection of the bacteria or even with the bacteroid differentiation in the infected cell, although conclusion about the molecular role of the genic product is not presently possible and will continue to be investigated.

Keywords: Nodulation. *Tnt1*. Symbiosis. Gen. Symbiotic Nitrogen Fixation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micrografia de corte histológico do nódulo indeterminado de <i>Medicago truncatula</i> (21 dias após a inoculação (dai)) mostrando a localização das regiões de meristema (I), infecção (II), diferenciação do bacteroide e maturação (II-III) e fixação simbiótica de nitrogênio (III)23
Figura 2	Desenvolvimento do nódulo de fixação de nitrogênio de <i>Medicago truncatula</i>25
Figura 3	Esquema representando os tecidos de um nódulo determinado (esquerda) e um indeterminado (direita).....29
Figura 4	Zoom na área do gráfico com maiores valores de expressão gênica.....38
Figura 5	Esquema da reação LR para a construção GRF_STOP::GFP, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados.....47
Figura 6	Esquema da reação LR para a construção GRF_NO_STOP::GFP, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados.....48
Figura 7	Esquema da reação LR para a construção Promotor::GUS, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados.....50
Figura 8	HMM logo do domínio de Pfam06839,.....53
Figura 9	Localização e arquitetura gênica54
Figura 10	Imagem parcial, focada no locus em estudo, da árvore filogenética do resultado da análise filogenética, com todos os membros da família ZF-GRF de <i>Medicago truncatula</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>A. lyrata</i>56

Figura 11	Árvore filogenética como resultado da filogenia gerada pelas dezoito sequências reconhecidas como maior similaridade com a proteína em estudo, do resultado da primeira análise filogenética....	57
Figura 12	Esquema da região promotora com alguns elementos marcados nas suas respectivas posições, esta figura é uma imagem das regiões reconhecidas pelo programa PLACE e marcadas manualmente em uma planilha, com o intuito de visualizar melhor como está a distribuição dos elementos	58
Figura 13	Esquema do gene em estudo com a inserção do <i>Tnt1</i> na linhagem NF1858 em seus respectivos direcionamentos e proporcionalidade, no qual o gene possui 1440 pb e a inserção <i>Tnt1</i> , 5334 pb, fora da proporcionalidade.....	65
Figura 14	Esquema do gene em estudo com a inserção do <i>Tnt1</i> na linhagem NF2990 em seus respectivos direcionamentos	65
Figura 15	Esquema do gene em estudo com a inserção do <i>Tnt1</i> na linhagem NF3070 em seus respectivos direcionamentos	65
Figura 16	Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRF-FW2+GRF-STOP-RV	68
Figura 17	Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFFw2 + <i>Tnt1</i> -fw (outer)	68
Figura 18	Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFFw2 + <i>Tnt1</i> Rv-outer ...	69
Figura 19	Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFRvStop + <i>Tnt1</i> Fw-outer.....	69

Figura 20 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFRvStop + Tnt1Rv-outer.....	70
Figura 21 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + GRF-stop-rv 70	
Figura 22 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Fw-outer.....	71
Figura 23 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Rv-outer.....	71
Figura 24 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-Fw-outer.....	72
Figura 25 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-rv-outer.....	72
Figura 26 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + GRF-stop-rv 73	
Figura 27 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Fw-outer.....	73
Figura 28 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Rv-outer.....	74

Figura 29 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-Fw-outer.....	74
Figura 30 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-rv-outer.....	75
Figura 31 Resultado do alinhamento da sequência do <i>Tnt1</i> com o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF1858#3.1	76
Figura 32 Posição e direcionamento da inserção <i>Tnt1</i> (em vermelho) no loco <i>Medtr7g086040.1</i> do mutante NF1858.....	77
Figura 33 Resultado do alinhamento entre a sequência do <i>Tnt1</i> e o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF2990#19.1, GRFFw2 + Tnt1Fw-outer	78
Figura 34 Posição e direcionamento da inserção <i>Tnt1</i> (em vermelho) no loco <i>Medtr7g086040.1</i> do mutante NF2990.....	79
Figura 35 Resultado do alinhamento entre a sequência do <i>Tnt1</i> e o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF3070#11.2, GRFFw2 + Tnt1Fw-outer	80
Figura 36 Posição e direcionamento da inserção <i>Tnt1</i> (em vermelho) no loco <i>Medtr7g086040.1</i> do mutante NF3070.....	81
Figura 37 Foto dos nódulos do genótipo mutante, NF1858#3, (esquerda) não apresenta a coloração rosa da leg-hemoglobina, e do tipo selvagem, R108, (direita) com a coloração característica da leg-hemoglobina, indício da deficiência de fixação de nitrogênio, no mutante	82

- Figura 38 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e do tipo selvagem, R108 (direita) inoculados com Sm1021-lacZ após a fixação e coloração com Red-Gal 83
- Figura 39 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e R108 (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal 83
- Figura 40 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e R108 (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal e seccionamento de 7 μm 84
- Figura 41 Foto de um nódulo do genótipo mutante complementado, NF1858#3::GRF, externa (esquerda) e interna (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal e cortadas com 7 μm 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes expressos durante a nodulação	35
Tabela 2	Primers utilizados	43
Tabela 3	Combinação de primers utilizados na genotipagem	45
Tabela 4	Elementos encontrados na região promotora em suas respectivas posições	59
Tabela 5	Tamanho do fragmento amplificado na PCR da genotipagem dos mutantes, usando os primers GRF_fw 2 e Tnt1-fw(outer)	64
Tabela 6	Resultados da genotipagem das sub-linhagens NF1858, NF2990 e NF3070	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Leguminosas	17
2.2	Nodulação	18
2.3	Fixação de nitrogênio em leguminosas: metabolismo e transporte	29
2.4	Fatores de transcrição envolvidos na interação simbiótica de FSN em leguminosas	33
2.5	<i>Medicago truncatula</i> como leguminosa modelo	36
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Material vegetal e tratamentos	40
4.2	Identificação do gene de estudo	41
4.3	Análise Filogenética	41
4.4	Desenho de primers	42
4.5	Análises de Promotor	43
4.6	Genotipagem dos mutantes	44
4.7	Construções Genéticas	46
4.8	Análise Fenotípica dos mutantes	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Localização cromossômica e arquitetura gênica	52
5.2	Análise Filogenética	55
5.3	Análise do Promotor	58
5.4	Perfil de expressão gênica de <i>Medtr7g086040.1</i>	63
5.5	Identificação de mutantes insercionais para o gene em estudo	63
5.6	Genotipagem e localização dos pontos de inserção	63
5.7	Localização dos pontos de inserção do retrotransposon	64
5.8	Fenotipagem do mutante NF1858	82
6	CONCLUSÕES	86
7	PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A fixação simbiótica de nitrogênio desempenhada pelas bactérias nitrificantes juntamente com a nodulação em leguminosas iniciou-se há cerca de 58 milhões de anos. O processo como um todo, desde a infecção das células das raízes até a senescência do nódulo, passando pela fase de fixação de nitrogênio, é controlado por uma grande rede genética. Sabe-se que um desses genes está localizado no locus Medtr7g086040, que é altamente expresso nos nódulos das raízes da leguminosa modelo *Medicago truncatula* já aos quatro dias após a inoculação com rizóbio (BENEDITO et al., 2008). Neste trabalho, formulou-se a seguinte hipótese: o gene localizado no locus Medtr7g086040 codifica um fator de transcrição essencial na fixação simbiótica de nitrogênio na leguminosa modelo *Medicago truncatula*. Assim, o objetivo com o trabalho foi melhor caracterizar o padrão de expressão do gene, identificar elementos conservados na região promotora que coordenam a expressão e caracterizar mutantes com o gene Medtr7g086040 silenciado com a inserção *Tnt1* retrotransposon de tabaco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leguminosas

As plantas leguminosas pertencem à família Fabaceae, a terceira mais abundante do reino vegetal. As leguminosas apresentam ampla distribuição geográfica e são antecidas apenas pelas famílias Orquidaceae e Asteraceae no número de espécies que compõem a família botânica. As leguminosas também são a segunda mais importante família para a alimentação humana, antecida somente pelos cereais da família Poaceae. As leguminosas são geralmente conhecidas por possuir o fruto em forma de legume, ou vagem. Esta família é dividida em três subfamílias, a parafilética Caesalpinioideae e monofilética as Mimosoideae e Papilionoideae. Aproximadamente 90% dos membros do clado monofilético e uma minoria da subfamília Caesalpinioideae apresentar nódulos nitrificantes (DOYLE et al., 1997; FARIA et al., 1989). As leguminosas surgiram há aproximadamente 60 milhões de anos, juntamente com a maior explosão de mamíferos, aves e insetos polinizadores no início da Era Cenozoica (LAVIN; HERENDEEN; WOJCIECHOWSKI, 2005; SPRENT, 2007, 2008).

O desenvolvimento dos nódulos nitrificantes possui uma história co-evolutiva entre o reino vegetal e o reino procarioto, de aproximadamente 58 milhões de anos (SPRENT, 2008; YOUNG et al., 2011). Hoje esta co-evolução se apresenta na forma de simbiose entre uma planta leguminosa e uma bactéria diazotrófica, formando o nódulo de fixação simbiótica de nitrogênio (FSN). A simbiose estabelecida na raiz, culminando com a formação do nódulo, é regulada geneticamente tanto pela planta como pela bactéria. A funcionalidade e permanência funcional do nódulo se dão por uma via de autorregulação que evita prejuízo metabólico para o hospedeiro (VEERESHILINGAM et al., 2004). O mecanismo estabelece um acordo de troca de compostos entre a planta e o

procarioto hospedado em um mecanismo autorregulável, entre patogenicidade e mutualismo. Nesse mecanismo, em condições genéticas e ambientais favoráveis para a FSN, uma interação entre tecidos vegetais e bactérias favorece a sobrevivência de ambos.

Enquanto o nódulo fornece produtos metabólicos nitrogenados derivados da FSN ao hospedeiro, esse órgão também é um dreno forte para a planta em fotoassimilados. Portanto, a taxa de FSN, o tamanho e a quantidade de nódulos em um hospedeiro são caracteres flutuantes e alterados com a condição genética, fisiológica, ambiental e nutricional da planta, (VALENTINE; BENEDITO; KANG, 2011). Este órgão possui um sistema vascular que faz a conexão entre o ambiente diazotrófico e o vegetal. Dessa forma, grande parte do nitrogênio reduzido pela bactéria, dentro do nódulo, pode ser utilizada pela planta, a qual pode desfrutar de um maior teor de nitrogênio e, consecutivamente, de proteínas nos tecidos (DUCZEKT; BUCHAN, 1981; GRAHAM; VANCE, 2003).

2.2 Nodulação

Os nódulos são estruturas hipertróficas e protusas encontradas em raízes ou caules de leguminosas, as quais promovem uma estrutura física, bioquímica e hormonal para a simbiose com bactérias diazotróficas. A capacidade de nodulação não está em todas as leguminosas, presente somente em torno de 15% da família (ALLEN; ALLEN, 1981). A nodulação está geralmente localizada nas subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae, sendo menos comum na sub família Caesalpinioideae (POLHILL; RAVEN; STIRTON, 1981; TRINICK, 1982). O desenvolvimento do nódulo é complexo e há a interferência de fatores ambientais e genéticos, assim como a complexidade da interação entre dois organismos de dois reinos distintos, vegetal e procariotos. Para se estabelecer a

simbiose e ocorrer à formação do nódulo, processos específicos precisam ocorrer, como:

- a) Pré-infecção: reconhecimento dos simbioss e interação entre ambos;
- b) Infecção da planta pela bactéria;
- c) Desenvolvimento do nódulo;
- d) Funcionamento dos nódulos (fixação simbiótica de nitrogênio);
- e) Controle e manutenção da simbiose e do nódulo;
- f) Senescência do nódulo.

A pré-infecção inicia-se com o reconhecimento entre os simbioss, o qual, é realizado através de moléculas flavonoides, dentre as quais luteolina, naringenina e ginstestina exsudadas pelas raízes da planta. Estas moléculas são percebidas pelas bactérias, induzindo a expressão dos genes de nodulação (fatores Nod) (HAEZE; HOLSTERS, 2002). O reconhecimento dessas moléculas varia de acordo com espécie hospedeira, de forma a ter-se uma especificidade de interação entre as espécies dos simbioss.

A indução genes *nod* na bactéria promove a síntese de lipoquitooligossacarídeos, que são moléculas de membrana que possuem como cadeia principal resíduos de β -1,4- ligado a um N-acetyl-D-glucosamina e cadeia acil não reduzida. As bactérias rizóbias possuem um grupo de genes *nodABC*, dos quais o *nodC* produz uma enzima que sintetiza um quitooligossacarídeo, e *nodB* e *nodA* codificam enzimas que sintetizam a cadeia principal desacetilada e a N-acetilada, respectivamente (GEURTS; BISSELING, 2002; HAEZE; HOLSTERS, 2002). Essa molécula é reconhecida por receptores presentes na epiderme do pêlo radicular e induzem o início do processo de infecção. De segundos a minutos após a presença dos fatores Nod, ocorrem respostas

celulares do pelo radicular via influxos de Ca^{+2} , o que aumenta o nível de cálcio citosólico, seguido por efluxos de Cl^- e K^+ . Esse movimento de íons despolariza a membrana plasmática das células epidérmicas da raiz e promove o aumento do pH do apoplasto (FELLE et al., 1999). Em torno de 15 minutos após a infecção do rizóbio, ocorre outro pico de cálcio perto do núcleo, independente de influxo de Ca^{+2} , em resposta às ativações posteriores. Aproximadamente uma hora após o reconhecimento dos fatores Nod pelo vegetal, se inicia o intumescimento e deformação do pelo radicular. Nesse estágio, ocorre uma reorganização do citoesqueleto e da rede de microtubulos que redireciona as vesículas para o ápice do pelo, mudando-se assim, a direção do crescimento do pelo radicular (GAGE, 2004). A infecção se inicia com a interação da bactéria com o pelo radicular, o que determina o enrolamento do pelo radicular, formando uma estrutura conhecida como “cajado de pastor” ou “*shepherd's hook*” (LIMPENS et al., 2003; SCHAUSER et al., 1999). *NIN* codifica um gene cujo produto funciona logo após a atuação da cálcio-calmodulina quinase (CCaMK) levando à morfogênese do nódulo. Embora esse gene não seja essencial para a sinalização dos fatores Nod, o *NIN* controla o padrão de expressão do gene precoce de nodulina, *ENOD11* (MARSH et al., 2007). A partir de toda reestruturação celular, a bactéria adentra o tecido vegetal passando pela membrana plasmática e levando à formação do canal de infecção (“*infection thread*”, CI). O canal de infecção é uma estrutura tubular que conduz a bactéria através da matriz celular das células do pelo radicular até as células vizinhas do córtex da raiz, onde ocorre a infecção intracelular e colonização. A colonização ocorre via endocitose, com a invaginação da bactéria no espaço intracelular das células próximas ao córtex, onde se forma o primórdio nodular que, via multiplicação e diferenciação celular, leva à nodulação (GAGE, 2004).

Durante a pré-infecção, a bactéria expressa os fatores Nod que são reconhecidos pelos receptores NFR, ativando os genes da simbiose, *SYMRK*, os

quais percebem o sinal da bactéria, e também do fungo endomicorrízico, ativando os transportadores de cátions e liberando cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma. Para isso, os genes *DM11* e *DM12* são induzidos na célula do pêlo radicular e promovem os picos de cálcio responsáveis pela sinalização e condição bioquímica na adaptação anatômica e funcional do processo de infecção. O gene *DM13*, que codifica uma proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CCaMK), é induzido e atua como um sinalizador do fator Nod, logo após os picos de cálcio, realçando a sua importância na condução do processo de infecção (ANÉ et al., 2002). Alguns genes precoces de nodulinas, como *ENOD11*, *ENOD12* e *RIP1*, que codificam uma peroxidase e duas proteínas ricas em prolina que são transcritos durante os estágios de pré-infecção e infecção, foram caracterizados na epiderme do pêlo radicular (COOK et al., 1995; JOURNET et al., 1994, 2001). O gene de nodulina *MtN1* também está associado com o processo de infecção e pode ser usado como marcador genético para este estágio (GAMAS; BILLY; TRUCHET, 1998; GAMAS et al., 2006). O *ENOD20* possui um papel na reorganização da parede celular durante o crescimento do canal de infecção (CI) ou diferenciação das células infectadas (GREENE et al., 1998). O *MtM6* é um marcador genético expresso imediatamente antes da penetração do canal de infecção (MATHIS et al., 1999).

O *ENOD40* é induzido no começo da nodulação, e seus transcritos foram localizados no primórdio nodular e nas células do periciclo. O efeito do silenciamento desse gene é uma redução na quantidade de primórdios de nódulo, mostrando-se ser um bom marcador deste estágio. O *ENOD40* também parece desempenhar função na diferenciação do bacteroide. Em nódulos, as bactérias são liberadas dos canais de infecção nas imediações da membrana do simbiossoma, a organela que acomoda as bactérias simbiontes nas células infectadas do nódulo. Entretanto, em nódulos de mutante *MtENOD40*, os bacteroides não se desenvolvem corretamente, levando a uma senescência

prematura (WAN et al., 2007). Em um estágio mais avançado de desenvolvimento e diferenciação do nódulo, os genes *ENOD2*, *ENOD8* e *CCS52A* podem ser utilizados como marcadores genéticos. Esses genes são induzidos em tecidos específicos e inicialmente expressos para a fixação de nitrogênio (DICKSTEIN et al., 1993; KUPPUSAMY et al., 2004; PRINGLE; DICKSTEIN, 2004). Uma mutação no gene *API* afeta principalmente a invasão no primórdio nodular no córtex interno, mas também pode estar envolvido nos estágios iniciais e posteriores ao crescimento do canal de infecção. Comparações da expressão dos marcadores simbióticos *MtENOD12*, *MtN6* e *MtENOD8* confirmaram essas observações. O gene *API* atua após os fatores de transcrição (FT) *ERN* e o *LIN* e anteriormente aos genes envolvidos nos estágios de desenvolvimento e fixação de nitrogênio (TEILLET et al., 2008).

O nódulo (Figura 1) é constituído por diversos tecidos vegetais formando regiões específicas, como a zona meristemática, região de reprodução celular; zona de infecção, região e de FSN, na qual bactérias são alocadas dentro da organela, chamada simbiossoma. O simbiossoma contém uma ou algumas bactérias. No caso da planta modelo em estudo, *Medicago truncatula*, cada simbiossoma contém apenas uma bactéria. No processo de formação do simbiossoma, a membrana plasmática sofre invaginação por um processo de endocitose e passa por um processo de diferenciação para conferir um ambiente propício à sobrevivência intracelular dos procariotos e à fixação de nitrogênio. O simbiossoma é caracterizado por uma membrana lipoproteica rica em transportadores, principalmente transportadores de malato e ácidos úricos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). A membrana do simbiossoma é originada da membrana plasmática vegetal, mas enriquecida com lipídeos e proteínas específicas, para formar uma interfase de troca de metabólitos entre da célula hospedeira, tecido vegetal, e o bacteroide (CATALANO et al., 2007; CATALANO; LANE; SHERRIER, 2004). Outra correlação entre diferenciação

do rizóbio e atividade meristemática do nódulo é encontrada no mutante *Mtsym1*, que é caracterizado pela alteração no processo de infecção, levando à presença de duas formas de nódulos não fixadores. Alguns nódulos são pequenos, circulares e têm o CI limitado às células da camada cortical da raiz, ao passo que, outros nódulos são longos, com infecção normal e liberação de bactéria, mas sem diferenciação (BÉNABEN et al., 1995).

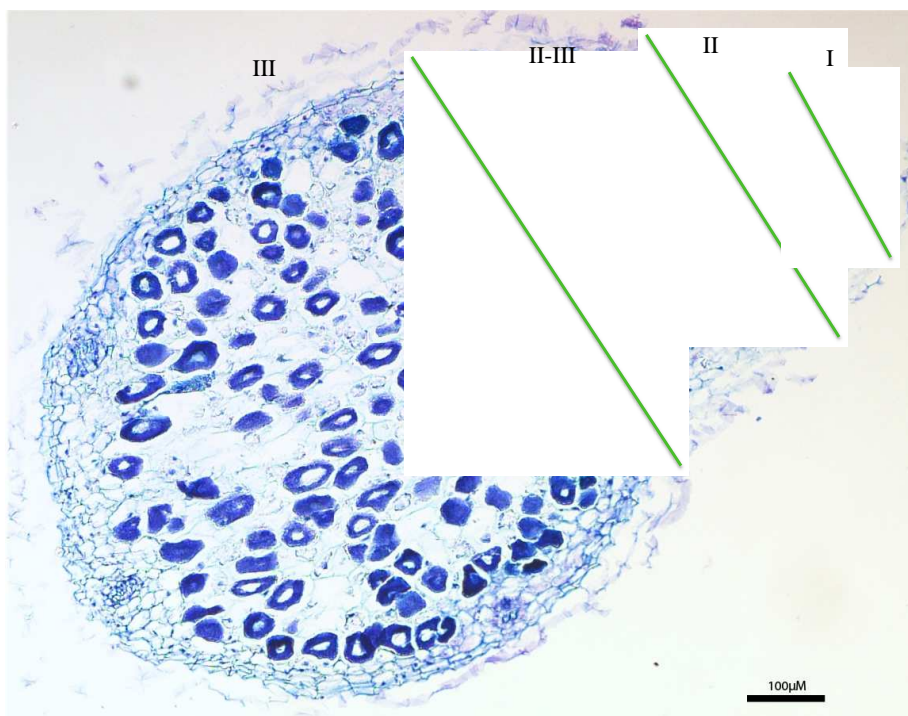


Figura 1 Micrografia de corte histológico do nódulo indeterminado de *Medicago truncatula* (21 dias após a inoculação (dai)) mostrando a localização das regiões de meristema (I), infecção (II), diferenciação do bacteroide e maturação (II-III) e fixação simbiótica de nitrogênio (III)

Nota: A região de senescência (IV) ainda não foi desenvolvida neste nódulo. O tecido foi corado com azul de toluidino.

Os estágios diferenciação do bacteroide e desenvolvimento do nódulo se caracterizam pela liberação da bactéria no espaço celular vegetal e sua diferenciação em bacteroide. Entretanto, o primórdio de nódulos indeterminados se desenvolve em zonas nodulares com um ativo meristema e zona de fixação (Figura 2). O gene *MtHAP2-1* está envolvido na função do meristema nodular e codifica uma subunidade do TF tipo HAP2.1, um complexo heterotrimérico de interação com o elemento de regulação de sequência CCAAAT. O gene HAP2.1 é expresso principalmente na zona meristemática de nódulos maduros bem como em nódulos em desenvolvimento. Em *Medicago truncatula*, o silenciamento de *MtHAP2.1* via RNAi atrasa a nodulação e retêm o crescimento do nódulo nos 8-10 dias após a inoculação (dai), resultando em um nódulo esférico e sem um meristema ativo. As células meristemáticas possuem formas anormais e acúmulo de vacúolos. Assim, não ocorre liberação das bactérias do CI, comprometendo o processo de fixação de nitrogênio. O fenótipo de um mutante silenciado sugere que o gene *MtAPH2.1* controla o desenvolvimento do nódulo por controlar a persistência do meristema e talvez até a liberação das bactérias. Interessantemente, esse gene é regulado pelo *miR169*, o qual desempenha um papel importante em delimitar a expressão espacial e temporal do gene *MtHPA2.1*, contribuindo para a transição das células da forma meristemática para diferenciada nos nódulos (EDWARDS; MURRAY; SMITH, 1998).

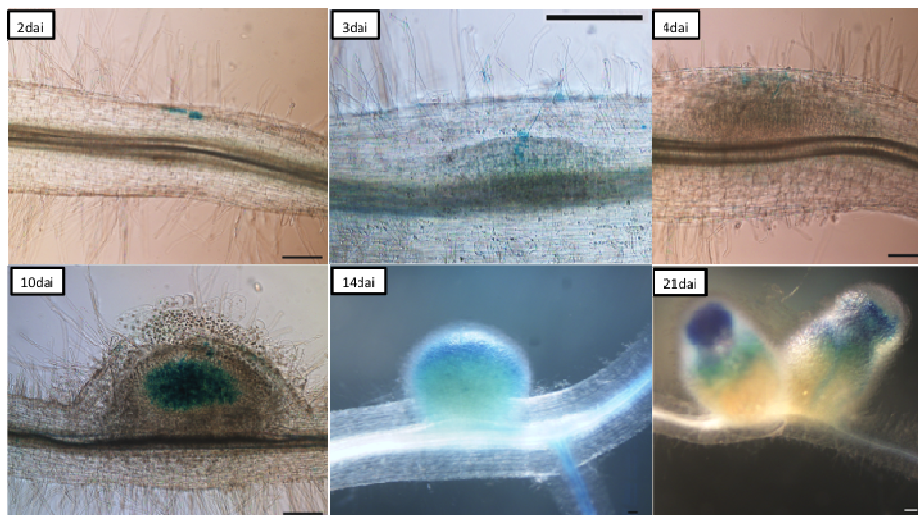


Figura 2 Desenvolvimento do nódulo de fixação de nitrogênio de *Medicago truncatula*

Nota: Em cada foto temos uma raiz de *Medicago truncatula* seus respectivos dias após a inoculação (dai) com Sm1021-lacZ corada com X-gal. Na primeira foto com 2 dai têm-se a presença das bactérias na raiz da planta. Com 3 dai têm-se a formação do canal de infecção demonstrado pela coloração azulada da bactéria dentro do pêlo radicular. Com 4 dai têm-se como nos 3 dai a multiplicação das células internas do córtex radicular formando o primórdio nodular. Aos 10 dai têm-se a extrusão do primórdio nodular para fora da raiz e o início da colonização das células vegetais que irão gerar as zonas nodulares. Aos 14 dai têm-se um nódulo formado e funcional de pequeno tamanho. E aos 21 dai têm-se uma foto de dois nódulos desenvolvidos e uma grande zona de fixação de nitrogênio.

Mutantes defeituosos na manutenção do meristema do nódulo apresentam numerosas infecções e compostos polifenólicos durante a nodulação e formação de raízes laterais, como os mutantes *nip* e *latd*. Ambos apresentam crescimento reduzido das raízes primária, laterais e desenvolvimento comprometido de nódulo após a emergência. Por isso, o gene *LATD* funciona na manutenção do meristema da raiz e do nódulo. Em nódulos brancos, anormais, ocorre falha na liberação das bactérias e falta de expressão de genes da bactéria e da planta envolvidos no desenvolvimento do bacteroide e fixação de nitrogênio,

sugerindo que a diferenciação da bactéria depende do desenvolvimento do nódulo, o qual necessita da manutenção do meristema e a expressão do *LATD* (BRIGHT et al., 2005; VEERESHILINGAM et al., 2004). O ácido abscísico resgata os defeitos do meristema da raiz de *latd*, mas devido aos efeitos negativos deste fitohormônio na iniciação do nódulo, o desenvolvimento do meristema não pode ser examinado (LIANG; MITCHELL; HARRIS, 2007). O crescimento da raiz e o controle da nodulação são auxiliados pelo gene *SUNN*, já que quatro mutantes com *Tnt1* neste gene apresentam fenótipos com raiz reduzida e super nodulação (SCHNABEL et al., 2005).

Um primeiro grupo de mutantes *dnf* contendo *dnf1-1*, *dnf1-2* e *dnf5*, mostraram infecção interna ao córtex, pouca ou nenhuma fixação de nitrogênio, e nenhuma expressão (*nifH*) ou indução (*MtN31*) de genes envolvidos na fixação de nitrogênio. Foi-se proposto que esses genes atuam anteriormente a outros genes *DNF*. Um segundo grupo de genes *DNF* inclui *DNF4* e *DNF7*, os quais mutantes com perda da função apresentaram comprometimento da fixação de nitrogênio e expressão de *nifH*, mas expressam *MtN31*. No terceiro grupo, mutantes dos genes *DNF3* e *DNF*, exibiram reduzida fixação de nitrogênio, mas suportando a expressão do *nifH* e expressa todos genes relacionados à nodulação (STARKER et al., 2006).

Vale ressaltar que em todo processo no qual uma molécula muda de ambiente numa célula eucariótica, é necessário atravessar uma membrana lipoproteica. Moléculas polares ou relativamente grandes necessitam da atuação de transportadores de membrana para facilitar o processo.

Os transportadores encontrados na membrana do simbiossoma são proteínas que fazem a conexão entre o ambiente procariótico e o vegetal. Existem dois tipos de transportadores, os que transportam material do tecido vegetal para a bactéria e os que transportam material da bactéria para o tecido vegetal. As bactérias necessitam de moléculas para o seu metabolismo

respiratório e FBN, principalmente ácidos dicarboxílicos como malato e succinato, e aminoácidos, como glutamato, glutamina, glicina, serina, e triptofano para produzir nódulos efetivos (BARSOMIAN et al., 1992; BRUIJN et al., 1989; KLEINER, 1985). No geral, os bacteroides são incapazes de transportar hexoses, exceto em *Bradirhizobium japonicum*, que expressa um transportador de frutose (UDVARDI; DAY, 1990). Há transportadores de ácidos dicarboxílicos na membrana do bacteroide, como a proteína *DctD*, que faz simporte de H^+/malato^- , bem como transportadores com alta afinidade com succinato, fumarato e malato foram identificados bioquimicamente na membrana do simbiosoma, embora a identidade genética desses transportadores ainda não esteja elucidada (UDVARDI; DAY, 1997). Mas sete mutantes com defeitos na fixação de nitrogênio (*dnf1* - *dnf7*) apresentam CI normais, similar ao tipo selvagem. A indução de promotores de genes rizóbios simbióticos (*nodF*, *exoY*, *bacA* e *nifH*) e atividade de redução de acetileno foram feitas na análise para diferenciação da bactéria e sua capacidade de fixação de nitrogênio. Dos quais um grupo, com *dnf1*, *dnf2* e *dnf5*, apresentam infecção nas células internas do córtex e indução da expressão do *MtN31* (STARKER et al., 2006).

O espaço entre os simbiosomas é rico em leg-hemoglobina, uma proteína vegetal que promove o ambiente necessário com baixa pressão de O_2 para o funcionamento efetivo da nitrogenase. Assim como a membrana da bactéria passa por diferenciação para formar o bacteroide, o simbiosoma como um todo se desenvolve numa estrutura altamente eficiente para a atuação da nitrogenase (VALENTINE; BENEDITO; KANG, 2011).

A nitrogenase é a enzima que reduz o azoto ($N_{2(g)}$) em amônia. Esta enzima é um complexo de duas proteínas: a dinitrogênio redutase, uma proteína contendo ferro-enxofre contendo centros de ferro-enxofre (FeS) do tipo [4Fe-4S] e a dinitrogenase propriamente dita, que possui sítio ativo composto por um centro de ferro-molibdênio (FeMo). A proteína de ferro-molibdênio, ou

componente I, é uma proteína tetramérica do tipo $\alpha_2\beta_2$ com quatro cadeias polipeptídicas de duas sequências diferentes e massa molecular total de cerca de 250 KDa. Cada dímero $\alpha\beta$ se liga a um centro FeMo, onde o N_2 é reduzido, e um centro de ferro-enxofre do tipo [8Fe-7S], também designado centro P1 (SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009). As subunidades α e β são os produtos dos genes *nifD* e *nifK* (EINSLE et al., 2002; SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009).

Este centro ativo interage com o nitrogênio. No entanto, o centro ativo também possui afinidade permanente com o oxigênio gasoso, tornando o sítio inativo em ambientes aeróbicos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

O ambiente citosólico da célula do nódulo na zona de fixação de nitrogênio é repleto de leg-hemoglobina, uma proteína que possui alta afinidade específica com o $O_{2(g)}$ e que promove um ambiente anóxico mais propício à FBN. A FBN no interior dos nódulos reduz o $N_{2(g)}$, o qual é fixado nos ácidos orgânicos fornecidos pela planta para a respiração dos bacteroides, geralmente o mais utilizado é o malato. A redução do N_2 em amônia é realizada nos bacteroides e a assimilação do N reduzido é feita no citosol da célula vegetal infectada. Os compostos orgânicos nitrogenados são então translocados aos órgãos drenos da planta (OLDROYD et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Existem dois tipos de nódulos em legumes (Figura 3): 1) os de crescimento determinado, caracterizados por serem circulares, cujas fases de desenvolvimento são delimitadas em cada fase de formação do nódulo, como os nódulos de soja, feijão e *Lotus japonicus*. 2) Os nódulos indeterminados possuem um meristema persistente no nódulo maduro, fazendo com que o nódulo continue crescendo indefinidamente, como em *Medicago truncatula*, alfafa, ervilha e na maioria das leguminosas de clima temperados (CRESPI; GÁLVEZ, 2000).

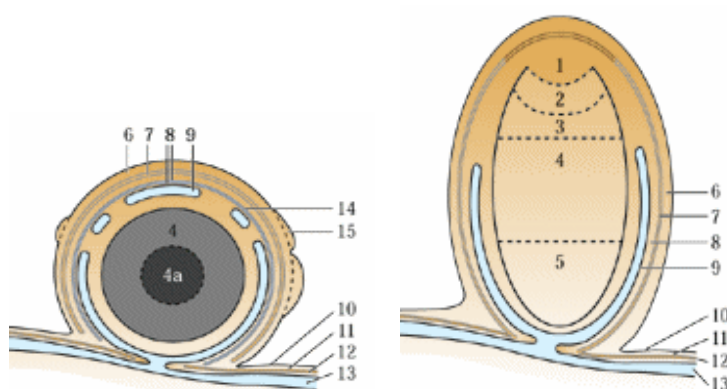


Figura 3 Esquema representando os tecidos de um nódulo determinado (esquerda) e um indeterminado (direita)

Fonte: Buchanan, Grissem e Jones (2000)

2.3 Fixação de nitrogênio em leguminosas: metabolismo e transporte

Os nódulos presentes nas raízes atuam como drenos fisiológicos fortes, consumindo 10-14% do carbono reduzido pela fotossíntese como fonte de energia para a fixação biológica do $N_{2(g)}$ (VALENTINE; BENEDITO; KANG, 2011). O estágio que envolve a fixação de nitrogênio se caracteriza após a formação de um simbiossoma funcional, com bacteroides diferenciados, passíveis de fixar nitrogênio pelo complexo da nitrogenase. O *LjSST1* é um transportador de sulfato localizado possivelmente na membrana do simbiossoma, e que provavelmente está envolvido no fornecimento de sulfato para o bacteroide pela planta. Quando o transporte de sulfato foi interrompido nos mutantes *Ljst1* e *Ljst2*, a quantidade de enxofre reduzida e a comprometeu a síntese da nitrogenase, resultando na fixação reduzida de nitrogênio e na senescência precoce do nódulo (KRUSELL et al., 2005).

Os genes dos FTs “homeobox” *NDX1* e *NDX2* estão envolvidos na nodulação em *Lotus japonicus* (GRONLUND et al., 2003). O silenciamento dos

genes *Ljndx1* e *Ljndx2* via RNA antissenso resultou na perda da função do nódulo. Embora os nódulos continuassem com a coloração rosada até três semanas após a inoculação, o transporte de nitrogênio do nódulo para a raiz foi reduzido, causado por uma redução da vascularidade. Com isso, os FT NDX podem estar participando de rotas de sinalização envolvidas na diferenciação das células do parênquima nodular dentro dos tecidos vasculares, bem como na formação de lenticelas e modificação da endoderme nodular, que é uma barreira natural à entrada de oxigênio no nódulo (GRONLUND et al., 2003).

O fornecimento de carbono para o bacteroide é de extrema importância para o funcionamento efetivo do nódulo. A sacarose sintase (*SUSY*), metaboliza a sacarose em UDP-glicose e frutose, fontes essenciais de carbono reduzido para o bacteroide. Análises em *M. truncatula* revelaram que há a expressão deste gene em células infectadas na zona de fixação, meristema, pré-infecção, zona interna do córtex e nos vasos do nódulo (HOHNJEC et al., 2003). Mutantes com perda da função nos genes *SucS1* em *M. truncatula* e *rug4* em ervilha mostraram menor atividade da *SUSY*, fixação de nitrogênio e senescência nodular precoce (BAIER et al., 2007; GORDON et al., 1999), resultando na baixa quantidade de proteínas solúveis e leghemoglobina, embora a expressão de genes nitrogenase não tenha sido alterada. Em geral os principais ácidos carboxílicos utilizados na respiração dos bacteroides são o malato e o succinato transportados através da membrana do simbiossoma (DAY; COPELAND, 1991). Um FT do tipo “dedos-de-zinco” (“zinc finger”) codificada pelo gene *Mszpt2-1* de alfafa é expressa nas flores, nódulos e tecido vascular em raízes próximas ao nódulo. A perda da função desse gene gerou plantas com fenótipo defectivo na fixação de nitrogênio (Fix⁻) (FRUGIER et al., 2000). Esses dados levaram à conclusão de que esse FT esteja envolvido na comunicação de célula a célula entre o tecido vascular e a zona de fixação, possivelmente coordenando a expressão de transportadores de metabólitos relacionados com o metabolismo de C e N na planta.

O complexo da nitrogenase converte o azoto, N_2 , em amônia, que é exportado do bacteroide para o citosol vegetal das células infectadas, onde é assimilado em aminoácidos ou ureídeos, dependendo da espécie, e então exportado do nódulo para o resto da planta. A glutamato sintase NADH-dependente (NADH-GOGAT), juntamente com o glutamina sintetase, catalisa a incorporação da amônia em glutamato, que é necessário para a eficiente assimilação de nitrogênio. Assim, a redução nos níveis de NADH-GOGAT em nódulos de alfafa resultou em deficiência de N nas plantas em condições de baixo nitrogênio, prejudicando a assimilação de N e alterando as razões C/N (CORDOBA et al., 2003). A asparagina, ao invés da glutamina, é a principal forma utilizada pelas leguminosas de ambiente temperado. Asparagina é sintetizada pela asparagina sintetase, que catalisa a transferência do grupo amino da glutamina para o aspartato. Por outro lado, as leguminosas tropicais, como feijão e soja, exportam ureídeos dos nódulos para o resto da planta (SHI et al., 1997; SILVENTE et al., 2008).

A senescência do nódulo é caracterizada pela perda da função do simbionte e a degradação o aparato de fixação de nitrogênio, normalmente apresentado em regiões dos nódulos com estágio mais avançado de desenvolvimento, culminando com a morte do bacteroide e degradação da célula hospedeira. Características estruturais da senescência em nódulos determinados e indeterminados, o envolvimento de hormônios, assim como o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido investigadas. No entanto nenhum desses sinais foi ainda completamente caracterizado. Em nódulos indeterminados, os primeiros sinais da senescência aparecem em uma simples célula infectada localizada no centro da zona de fixação que se estende para as camadas celulares subjacentes, em direção ao córtex celular. Além do desenvolvimento, uma forma senescente cônica migra da base ao ápice do nódulo até a completa senescência do órgão. Em estudos de microscopia, pode-

se dividir a zona de senescência em duas regiões, uma parte mais nova e outra mais avançada. A degradação do bacteroide e sua reabsorção são visualizadas na parte mais nova, enquanto na região mais avançada de senescência, as células hospedeiras se apresentam totalmente vacuoladas e desprovidas de simbiose. Um grupo de proteinases de cisteína (MtCP1-MtCP6) foi apresentado como reguladas em antecedência à senescência natural do nódulo e produzida no estágio inicial da degradação das células infectadas. Análises de atividade promotora do *MtCP6* revelaram que este gene pode ser um bom marcador para o estágio senescente inicial do nódulo (PUPPO et al., 2005; VELDE et al., 2006). Outros componentes específicos, como a proteína box-Skp1-cullin-F de ubiquitina/26S, de rota de degradação proteica via proteassoma, são observados durante a senescência, indicando a importância da degradação organizada de proteínas. Ademais, a transcrição de genes responsáveis pelo transporte de nutrientes, como fosfato, aminoácidos e proteínas ligadas à ATP são pré-reguladas em células senescentes (VELDE et al., 2006). Os hormônios vegetais possuem um papel paralelo à senescência de folhas e flores, como o etileno, giberelinas (GAs) e ácido abscísico (ABA) na senescência do nódulo. Baseados em experimentos de perfil transcricional em *M. truncatula*, etileno e GA3 podem apresentar papel positivo e negativo, respectivamente, no desenvolvimento senescente de nódulos (VELDE et al., 2006).

O gene *DNF2* codifica uma proteína do tipo C-fosfolipase fosfatidilinositol (OI-PLC-XD) que previne contra a senescência precoce do nódulo e reações de defesa celular, além de desempenhar importante papel na persistência do bacteroide (BOURCY et al., 2013).

Além dos hormônios, as ROS são importantes no estágio senescente. Alguns relatos demonstram que há redução em enzimas antioxidantes ascorbato e glutatona durante esse estágio. No início da senescência natural é controlada pelo desenvolvimento da senescência, mas pode ser induzida precocemente por

estresses ao escuro, fertilização nitrogenada, e estresses salino e hídrico (ESCURADO et al., 1996; GÁLVEZ; GONZALEZ; ARRESE-IGOR, 2005; SHEOKAND; DHANDI; SWARAJ, 1995; SWARAJ et al., 2001), apesar dos processos serem muito diferentes quando se comparam uma senescência natural da induzida por fatores ambientais externos.

2.4 Fatores de transcrição envolvidos na interação simbiótica de FSN em leguminosas

Fatores de transcrição (FT) são proteínas que se ligam às regiões regulatórias do DNA de células eucarióticas e desempenham o controle da expressão de genes. Durante o processo de infecção e formação do nódulo, muitos FTs são necessários. Os genes de FTs *NSP1* e *NSP2* são pertencentes à família GRAS e requeridos, juntamente com o *DMI3*, no processo de simbiose com fungos micorrízicos arbusculares, dando-nos uma ideia geral da rota simbiótica comum entre a micorrização por fungos e nodulação por bactérias diazotróficas (KALÓ et al., 2005; OLDROYD; DOWNIE, 2004; RIVAL et al., 2012; SMIT et al., 2005). Esses genes são fortemente induzidos durante a nodulação e também por citocinina (GONZALEZ-SAMA et al., 2006). *NSP1*, *NSP2*, *ERN1*, *ERN2*, *ERN3* e *NIN* são essenciais antes dos sinais de citocinina, permitindo o reconhecimento para ativar a expressão gênica na epiderme e induzir a organogênese inicial do nódulo no córtex da raiz (MARSH et al., 2007; SMIT et al., 2005, 2007). *ERN2* e *ERN3* estão diretamente ligados ao *ENOD11*. Enquanto os FTs *ERN1* e *ERN2* são ativadores da expressão do *ENOD11*, o *ERN3* é seu repressor (ANDRIANKAJA et al., 2007). O produto gênico codificado por *NIN* faz a interceptação nodular por codificar uma proteína com domínio de membrana e um domínio de ligação ao DNA (MARSH et al., 2007). Já os genes *NSP1* e *NSP2* codificam duas cadeias polipeptídicas que se

heteropolimerizam para induzir a mudança da expressão de genes essenciais específicos à simbiose de raiz (HIRSCH et al., 2009). O regulador resposta RR1 do tipo B é induzido durante a nodulação e está associado com o sinal de transdução após receptores de citocininas *LHK1/CRE1* (PLET et al., 2011).

FTs adicionais presentes no meristema do nódulo são necessários para o desenvolvimento do nódulo, como *HAP2.1* em *M. truncatula* e *ERF1* em *L. japonicus* (ASAMIZU et al., 2008; COMBIER et al., 2007). A função desses genes ainda não é conhecida, mas o silenciamento de *HAP2.1* e *ERF1* revela funções de manutenção e possível iniciação do meristema do nódulo (ASAMIZU et al., 2008; COMBIER et al., 2007). A expressão de *HAP2.1* é regulada pelo microRNA *miR169* (COMBIER et al., 2007) e pelo *miR166*, que também é induzido no meristema do nódulo (BOUALEM et al., 2008). Durante a morfogênese do nódulo, FTs GRAS são necessários, até mesmo os envolvidos no controle do padrão das raízes laterais, como os INSENSÍVEL AO ÁCIDO GIBERÉLICO (GAI), REPRESSOR DO GAI (RGA) e SCARECROW (SCR) (HIRSCH; OLDROYD, 2009).

Tabela 1 Genes expressos durante a nodulação

Gene	Local de expressão	Processo
<i>NFR1/NFR5</i>	Epiderme do Pêlo da Raiz	Pré-Infecção
<i>NAP1/RIT1</i>		
<i>PIRI</i>		
<i>FLOT2</i>		
<i>FLOT4</i>		
<i>LIN/CERBERUS</i>		
<i>MMPL1</i>		
<i>nsRING</i>		
<i>PUB1</i>		
<i>RPG</i>		
<i>SYMREM1</i>		
<i>VAPYRIN</i>		
<i>SYMRK</i>		
<i>NUP85</i>		
<i>NUP133</i>	Epiderme do Pêlo da Raiz	Infecção
<i>NENA</i>		
<i>Castor</i>		
<i>POLLUX</i>		
<i>CCaMK</i>		
<i>Cyclops</i>		
<i>NSP1, NSP2</i>		
<i>ERN1</i>		
<i>NIN</i>		
<i>NIP</i>		
<i>ITD1/ITD4</i>		
<i>LOT1</i>		
<i>CRINKLE</i>		
<i>MtCRE1</i>		
<i>LHK1/CRE1</i>		
<i>RR1, RR4</i>		
<i>NSP1/NSP2</i>		
<i>NIN</i>	Raiz Interna e Centro do	
<i>HAP2.1</i>	Córtex da Raiz	Pré-organogêse
<i>ERF1</i>		
<i>API</i>		
<i>BRUSH</i>		
<i>LHK1</i>	Raiz	Nodulação
<i>SICKLE</i>		
<i>ALB1</i>	não definido	não definido

Fonte: (OLDROYD et al., 2011).

O reconhecimento dos sinalizadores dá especificidade e reestruturação à membrana plasmática da célula vegetal, o que é extremamente importante durante o processo de infecção. A ubiquitina E3 ligase Plant U-box1 (PUB1), interage fosforilando a *LYK3*. Outras duas ubiquitina E3 ligases, LUMPY INFECTION (LIN)/CERBERUS e o “finger RING” específico do nódulo (nsRING) também são necessários na infecção (KISS et al., 2009; SHIMOMURA, 2005; YANO et al., 2006). A ubiquitina do proteossoma em plantas mostrou-se regulada por receptores do tipo quinase *CERK1*, um homólogo ao *LYK3* (GIMENEZ-IBANEZ et al., 2009) e e *FLS2* (insensível flagelina 2), uma proteína rica em repetições de leucina (LRR) similar ao receptor do tipo quinase SYMRK (GOEHRE et al., 2008).

2.5 *Medicago truncatula* como leguminosa modelo

A espécie *Medicago truncatula* é uma leguminosa anual, com ciclo de dez meses, usada em pesquisas genômicas e considerada como um sistema modelo para estudos moleculares da nodulação e FBN. Essa planta é nativa da região mediterrânea, possui um crescimento de até 60 centímetros de altura, folhas trifoliadas, normalmente com manchas vermelhas na base de cada folíolo. *Medicago truncatula* foi escolhida como um organismo modelo para a biologia de leguminosa por ter um genoma diploide relativamente pequeno (500 Mb) com 8 cromossomos, por ser autógama, ter ciclo relativamente curto e protocolo eficiente de transformação genética. Este organismo faz simbiose com rizóbio (*Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae*) bem como com fungos micorrízicos arbusculares. No caso das simbioses fixadoras de nitrogênio, há a formação do nódulo, onde ocorre a associação mutualística das duas espécies (BARKER et al., 1990). O genoma de *Medicago truncatula* foi sequenciado em 2011

(YOUNG et al., 2011) promovendo melhores condições às pesquisas genéticas moleculares e funcionais.

O retrotransposon *Tnt1* foi utilizado para promover variabilidade genética, gerando uma coleção com 7.600 linhagens mutantes independentes no genótipo R108 de *M. truncatula*, com uma estimativa de 190.000 inserções na coleção como um todo, ou seja, cerca de 25 inserções por linhagens em média (TADEGE et al., 2008). Esta variabilidade genética mutante é essencial para estudos como este e de genômica funcional. O *Tnt1* é um elemento retrotransponível do tipo 1 (copia-e-cola) originário de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com de mais de 5 Kb de extensão e que se torna estável após a inserção, silenciando assim do gene onde foi alocado (ERFURTH et al., 2003; TADEGE et al., 2008).

Acredita-se que as linhagens NF1858, NF2990 e NF3070 que possuem a inserção TNT1 no gene de estudo, *Medtr7g086040.1*, apresentam genótipo mutante e consecutivamente fenótipo não funcional para a característica promovida por este gene, a qual ainda não é conhecida.

3 OBJETIVOS

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente as linhagens NF1858, NF2990 e NF3070 mutantes no gene *Medtr7G086040.1* que possui alta expressão no nódulo de fixação de nitrogênio da planta modelo para nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio *Medicago truncatula*, figura 4.

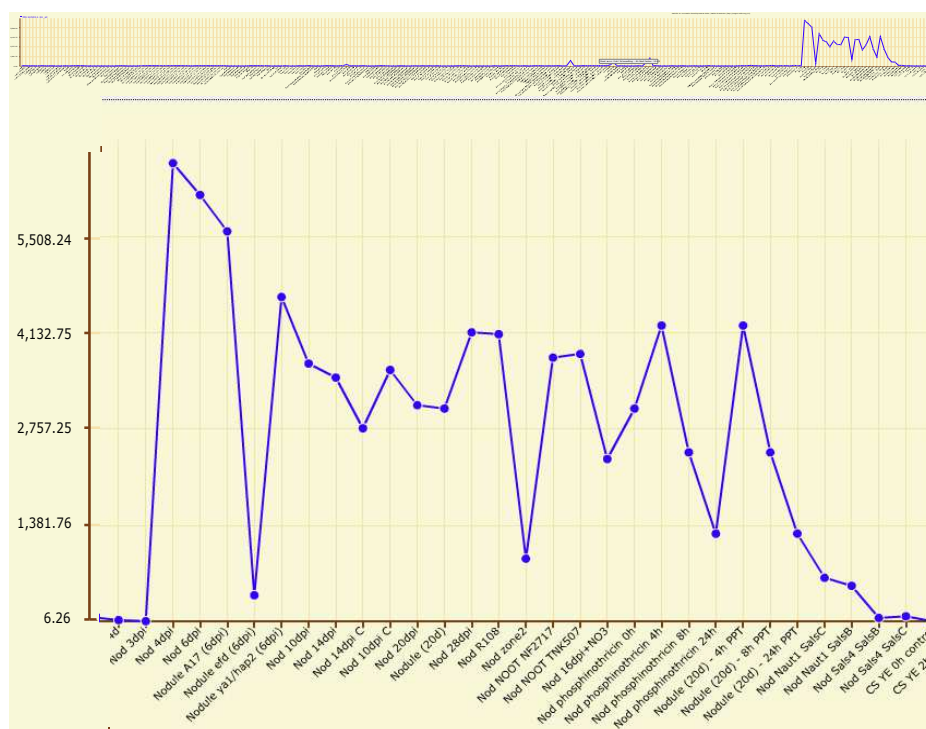


Figura 4 Zoom na área do gráfico com maiores valores de expressão gênica

Fonte: (TRANSCRIPT..., 2013).

Estudando a expressão do gene em estudo pelo site mtgea.noble.org. Visualizamos as amostras que apresentaram maior expressão em ordem decrescente foram: Nod 3dai, Nod 4dai, Nod 6dai, Nodule A17 (6dai), Nodule

yal/hap2 (6dai), Nod 28 dai, Nod R108, Nod phosphinothricin 4 h, Nodule (20d) – 4 h PPT, Nod NOOT TNK507, Nod NOOT NF2717, Nod 10dai, Nod 10dai C, Nod 14dai, Nod 20dai, Nodule (20d), Nod phosphinothricin 0 h, Nod 14dai C, Nod phosphinothricin 8 h, Nodule (20d) – 8 h PPT, oot Nod 5wk LimtN2 N2C, Nod phosphinothricin 24 h, Nodule (20d) – 24 h PPT, Nod zone2, Root A17 5d seedling - 3dai Sinorhizobium, Nod Naut1 SalsC e Nod Naut1 SalsB, A17 LimN, Root Nod 5wk SuffN2 N2S e Nodule efd (6dai). Mas 234 amostras apresentaram expressão praticamente nula nos demais tecidos em estudo. Conclui-se que este gene é expresso especificamente nos nódulos que fazem a fixação de nitrogênio.

Ao que tudo indica, este gene atua no processo de manutenção das bactérias, ou no processo de fixação propriamente dito. Segundo a tabela proposta por Pislariu et al. (2012), o mutante NF1858 tem o fenótipo Nod⁺Fix⁻, nódulos brancos ineficientes na fixação de nitrogênio, com plantas verde pálidas ou folhas amareladas devido à falta de nitrogênio.

Objetiva-se elucidar a função da proteína em estudo, já que há indicações desta ser um fator de transcrição, devido à presença de domínio reconhecido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na tentativa de elucidar o possível papel do gene no estudo fez-se a identificação da expressão de onde e quando este gene é expresso. Análise filogenética, direcionando uma possível função e relações evolutivas e de parentesco. Genotipagem para localização da inserção mutagênese, assim como fenotipagem por construções genéticas para resgate da função nas plantas homocigotas recessivas mutantes, localização subcelular da proteína decodificada por este gene e expressão por localização da expressão pelo gene repórter GUS.

4.1 Material vegetal e tratamentos

Os genótipos de tipo selvagem de *Medicago truncatula* 'A17' e 'R108' foram usados neste estudo, bem como as linhagens mutantes, NF1858 (sublinhagens NF1858-3 e NF1858-14), NF2990 e NF3070, adquiridas do banco de germoplasma da "Samuel Roberts Noble Foundation". As metodologias usadas para quebra de dormência da semente, crescimento, inoculação, transformação e condução das plantas foram baseadas no "Manual de *Medicago truncatula* (BAKER et al., 2006; GARCIA; BARKER; JOURNET, 2006). As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação e incubadora de crescimento a uma temperatura dia/noite de 24 °C/22 °C, respectivamente. A dormência das sementes foi quebrada por escarificação química com ácido sulfúrico seguida por vernalização a 4 °C por 72 horas no escuro. O início da germinação foi realizado em placa de Petri por 48 horas em bancada do laboratório sob luz fluorescente e temperatura ambiente. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para potes plásticos com substrato Metro-Mix 360 (no caso de

produção de sementes) ou mistura de vermiculita e turface (1:1, para estudos de nodulação).

Para a nodulação, utilizou-se a bactéria diazotrófica *Sinorhizobium meliloti* (Sm1021-lacZ) cultivada em meio de cultura YM líquido. A cultura foi centrifugada e ressuspensa em meio B&D sem nitrogênio para $OD_{600} = 0.05$. A inoculação ocorreu aos 4 dias após o plantio nos potes definitivos.

4.2 Identificação do gene de estudo

O perfil de expressão do gene foi acessado pelo Medicago Gene Atlas (mtgea.noble.org) utilizando a probeset Mtr.14503.1.S1_at.

Identificação da proteína GRF (MtN20): a anotação do genoma de *M. truncatula* pelo IMGAG (versão V4.0) e sequências das proteínas foram avaliadas a partir do banco de dados de Medicago (UMN MEDICAGO RESOURCES, 2013).

Os domínios conservados foram analisados pelo site do Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>). As regiões 3'UTR e 5'UTR do transcrito foram confirmadas usando a metodologia RACE (ExactSTART Full-Length cDNA Library Cloning Kit) via sequenciamento direto dos fragmentos de PCR isolados em gel de agarose a 1%.

4.3 Análise Filogenética

Análise filogenética molecular foi realizada utilizando-se a sequência de aminoácidos (aa) das proteínas contendo o domínio PF06839. Foram identificados 144 indivíduos da família ZF-GRF para as espécies *M. truncatula*, *Arabidopsis thaliana* e *A. lyrata* a partir do banco de dados de Medicago

(BIOINFORMATICS LABORATORY, 2013) versão 4.0, em conjunto com o banco de dados Phytozome (JOINT GEONME INSTITUTE, 2013) pelo método de BLAST (GOODSTEIN et al., 2012). O alinhamento das sequências e análise filogenética, usando o método de Máxima Parcimônia na qual os valores de bootstrap foram calculados com 10,000 interações pelo programa “MEGA5.2.1”

4.4 Desenho de primers

A sequência de DNA, cDNA do gene de interesse foram adquiridas a partir do site da Noble Foundation (<http://bioinfo3.noble.org/getseq/>) acessando a última versão, Mt3.5v4. Os primers foram desenhados usando o site PRIMER3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) com os parâmetros abaixo e com ajustamento manual:

Temperatura ideal de 60 °C, comprimento de cada primer entre 15 e 30 bases e tamanho do amplicon dependendo da região de interesse a ser isolada.

Tabela 2 Primers utilizados

<u>Região codante:</u>	
GRF_fw 1: 5'-CACCCACCACACTCACCTAT	Tm: 56.6°C
GRF_fw 2: 5'-CACCGGTTAGTCTCTCTATTTATATGTGATG	Tm: 56.4°C
GRF_rv_no_stop: 5'-TTTCGAACCCTTCAAACCACC	Tm: 55.7°C
GRF_rv_stop: 5'-CCAAGTCTAATACATCAATTGTA CTCCGC	Tm: 57.3°C
GRF_Fw 3: 5'-GAGTTGCAGGAAACCACGATTGAGAG	Tm: 59.6°C
<u>Região Promotora:</u>	
ProGRF_fw: 5'-CACCTTTAGAGGTGTTGGATGG	Tm: 55.4°C
ProGRF_rv: 5'-CACATATAAATAGAGAGACTAACCTTATCCTC	Tm: 54.3°C
ProGRF-fw-out2: 5'-GAGCAGCACTCACACGAGAAGTC	Tm: 59.3°C
ProGRF-Rv-out-2: 5'-GACTTCTCGTGTGAGTGCTGCTC	Tm: 59.7°C
ProGRF-Fw-3: 5'-CACCGTGGCAGTGACACAT	Tm: 58.1°C
ProGRF-RV-in-2: 5'-CACATCACATATAAATAGAGAGACTAA	Tm: 57.4°C
<u>Primers Tnt1:</u>	
Tnt1-fw(outer): 5'-ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	Tm: 58.2°C
Tnt1-rv(outer): 5'-CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG	Tm: 58.1°C
Tnt1-fw(nested): 5'-TCCTTGTTGGATTGGTAGCCAACCTTTGTTG	Tm: 61.0°C
Tnt1-rv(nested): 5'-TGTAGCACCGAGATACGGTAATTAACAAGA	Tm: 58.9°C

4.5 Análises de Promotor

A região genômica de 2.150 pares de bases (pb) anterior ao códon de iniciação do gene Medtr7g086040.1 (de 26.012.052bp até 26.014.202bp do cromossomo 7) foi utilizada tanto nas análises *in silico* como na clonagem para fusão com marcador GUS. O programa PLACE (MOCHIDA et al., 2010) foi utilizado para identificação dos elementos regulatórios conservados da região

promotora do gene em estudo. Notou-se a existência de um gene na posição - 2.262bp (Medtr7g086030.1) na direção oposta à do gene estudado. Assim, é possível que a região promotora do gene em estudo seja parcialmente compartilhada com o gene vizinho (HIGO et al., 1999; PRESTRIDGE, 1991).

A sequência da região promotora foi acessada pelo site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) onde se procurou uma região genômica referida. Para amplificação da região genômica, utilizou-se a estratégia de “nested” primers. O produto amplificado foi sequenciado e utilizado para construir um vetor fusionado o marcador GUS.

4.6 Genotipagem dos mutantes

As genotipagens dos mutantes foi feita por PCR “nested” com a enzima Polimerase TaKaRa Ex-taq utilizando-se combinações de primers do gene em estudo com “primers-out” do Tnt1. Desta forma pode-se localizar a inserção do Tnt1 no gene de interesse da linhagem mutante. As extrações de DNA foram feitas usando o kit MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicenter). Para cada 20 µL de reação de PCR usamos 9,9 µL de H₂O, 4,0 µL de betaína [5 M], 2,0 µL de 10X TakaRa Ex-Taq Buffer, 1.6 µL de dNTPs [2.5 ng/µL cada], 0.8 µL de Primer 1 [10 µM], 0.8 µL de Primer 2 [10µM], 0,1µL de TaKaRa-Ex-taq [5u/µL] e 0,8 µL de DNA [100ng/µL]. Na PCR da genotipagem usou-se um ciclo de ativação de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos consecutivos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 62 °C por 30 segundos e extensão a 70 °C por 2 minutos, e um ciclo de estabilização a 72 °C por 2 minutos, com a combinação de primers abaixo (Tabela 2).

Tabela 3 Combinação de primers utilizados na genotipagem

PCR	Primer 1	Primer 2
1	GRF_fw 2	GRF_rv_stop
2	GRF_fw 2	Tnt1-fw(outer)
3	GRF_fw 2	Tnt1-fw(outer)
4	GRF_rv_stop	Tnt1-rv(outer)
5	GRF_rv_stop	Tnt1-rv(outer)

As análises de sequenciamento das amostras foram feitas via sequenciamento de plasmídeo ou sequenciamento direto via amostra extraídas da banda de gel de agarose. O sequenciamento usando amostras de plasmídeos foi usado durante o processo de clonagem e o sequenciamento direto foi usado para localizar o ponto de mutação. Na preparação das amostras de plasmídeo para sequenciamento usou-se o kit de extração UltraClean® 6 Minute Mini Plasmid da MOBIO, adquirindo uma concentração de 300-400 ng/μL por amostra. E na extração de banda de gel usamos o kit Illustra GFX PCR DNA (GE Healthcare Life Sciences), a uma concentração de maior que 30 ng/μL por amostra, segundo querido pela Genome Core Facility da West Virginia University. No sequenciamento de plasmídeo, vetor de clonagem, usamos o primer M13-Fw, para ambos os plasmídeos pENTR ou pCR8, e para sequenciamento direto de banda de gel utilizou o mesmo primer forward usado na PCR.

Fragmentos das linhagens NF1858#3-1, NF2990#19.1, NF3070#11.2 amplificados com os primers GRF_fw 2 e Tnt1-fw(outer) foram enviados para sequenciamento com o primer Tnt1-fw(outer) para identificação do ponto exato de inserção do retrotransposon *Tnt1* no gene em estudo.

4.7 Construções Genéticas

Para o isolamento do gene e construções genéticas para os estudos de promotor-GUS, localização subcelular e complementação dos mutantes foram feitas PCR para amplificação do fragmento e extração de banda de gel com o kit “Ilustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification”. A banda de interesse foi sequenciada e os resultados alinhados pelo Clustal W2, para analisar a integridade da sequência.

Para os estudos de complementação o fragmento com stop códon, amplificado com os primers GRF_fw_2 e GRF_rv_stop em uma amostra de cDNA em PCR. O produto da PCR foi clonado em vetor de clonagem pENTR, usando primer “forward”, o qual possui a sequência “CACC” no seu início como requerido pelo protocolo, para obter-se o reconhecimento e promover a direcionamento na clonagem. Após clonado o vetor foi armazenado em biblioteca gênica utilizando *E. coli* TOP10 (Life Technologies), via transformação por choque térmico. O fragmento de cDNA contendo a região codante foi inserido em plasmídeo binário para complementação genética (pUBIC/DR-GFP) utilizando-se o método de recombinação Gateway com o kit LR Clonase™ II Enzyme Mix (Life Technologies). Após a clonagem em *E. coli*, o vetor foi transferido para *Agrobacterium rhizogenes* ‘Arqual’ pelo método de congelamento e derretimento (“Freeze-Thaw Method”) (HOLSTERS et al., 1978) modificado por Jyothishwaran et al. (2007).

Para os estudos de complementação dos mutantes, ou resgate da função do gene, amplificou-se a região codante do gene em estudo sem o stop códon, utilizando os primers GRF_fw 2 e GRF_rv_stop em uma amostra de cDNA, previamente sintetizada, via extração de RNA e síntese de cDNA usando o kit *mirVana*® (Life Technologies). Após a confirmação da integridade da sequência, por sequenciamento, realizou-se a transformação de um plasmídeo de destino,

pUBIC/DR-GFP, por reações de recombinação do tipo RL da região codante completa, com o códon de terminação, como apresentado na Figura 5. O qual foi clonado em ‘Arqual’, como o fragmento anterior, para a transformação das plantas mutantes com o gene de interesse ligado à proteína GFP, usando as mesmas metodologias do estudo de complementação do mutante.

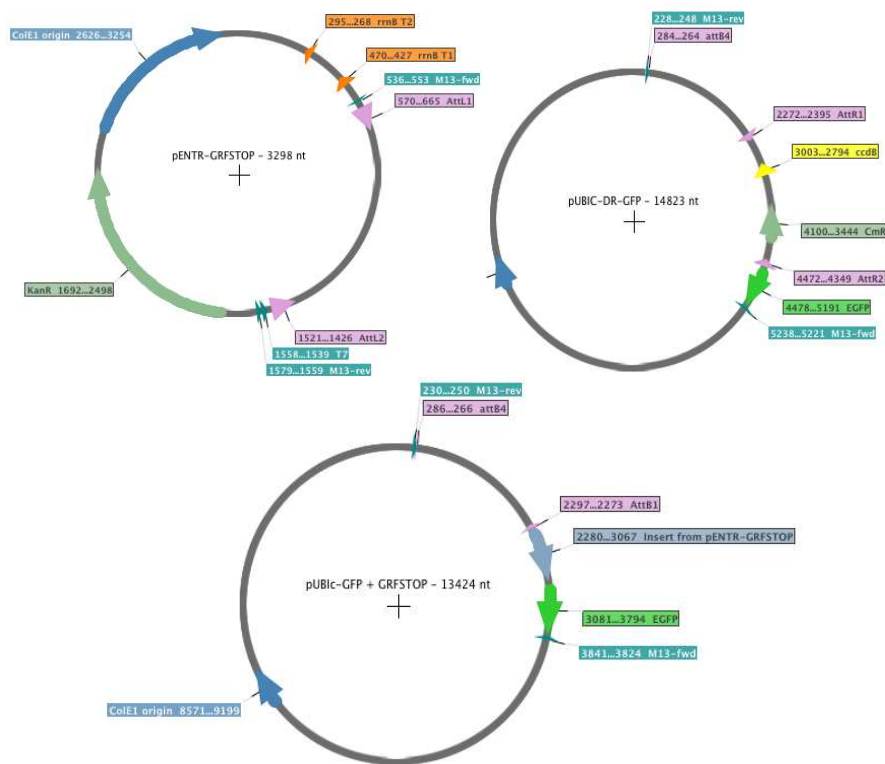


Figura 5 Esquema da reação LR para a construção GRF_STOP::GFP, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados

Nota: Reação entre o pENTR-GRF_STOP e pUBIC/DR/GFP resultando em pUBIC/DR/GRF_STOP/GFP.

Para os estudos de localização subcelular, amplificou-se a região codante do gene em estudo sem o stop códon, utilizando os primers GRF_fw 2 e GRF_rv_no_stop em uma amostra de cDNA. Após a confirmação da integridade da sequência, via sequenciamento, realizou-se a transformação de um plasmídeo de destino, pUBIC/DR-GFP, por reações de recombinação do tipo RL onde o GFP inicia-se antes do STOP, como apresentado na figura 6. O qual foi clonado em Arqual, como o fragmento anterior, para a transformação das plantas mutantes com o gene de interesse ligado à proteína GFP, usando as mesmas metodologias do estudo de complementação do mutante.

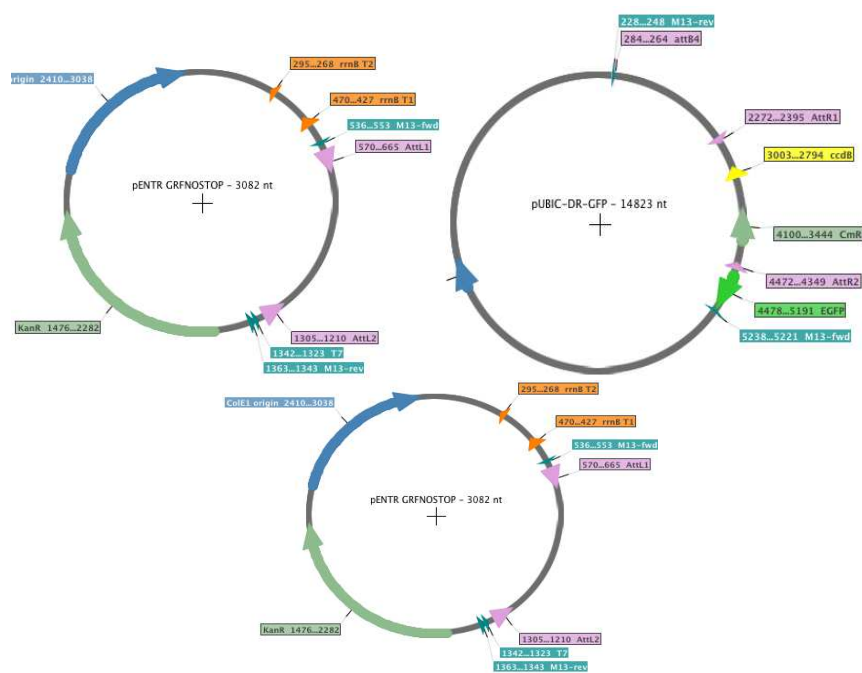


Figura 6 Esquema da reação LR para a construção GRF_NO_STOP::GFP, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados

Nota: Reação entre o pENTR-GRF_NO_STOP e pUBIC/DR/GFP resultando em pUBIC/DR/GRF_NO_STOP/GFP.

Para estudo de localização da expressão foi feita a clonagem chamada Promoter-GUS, que possui o gene repórter GUS o qual expressa a proteína β -glucuronidase que é naturalmente de cor azul e induzida pelo mesmo promotor do gene em estudo. Ou seja, onde e quando ocorre a indução da expressão do gene em estudo, irá induzir a expressão do GUS pigmentando o tecido naturalmente de azul. Para isto, foi feita a amplificação da região promotora utilizando a metodologia de “Nested PCR” em duas PCR a primeira com os primers ProGRF-fw-out2 e ProGRF-Rv-out-2 e a segunda PCR com os primers ProGRF-Fw-3 e ProGRF-RV-in-2. Sendo que o produto de PCR utilizado na segunda reação foi adquirido por extração da banda do gel da primeira PCR.

Como resultado da segunda PCR foi feita a extração do fragmento do gel de PCR e o clonamos em pENTR, como vetor de clonagem, para ser inserido no vetor de destino, pKGWFS7, por reações de recombinação do tipo RL como apresentado na figura 7, usado para a transformação das plantas via *Agrobacterium rhizogenes*, ARqua1.

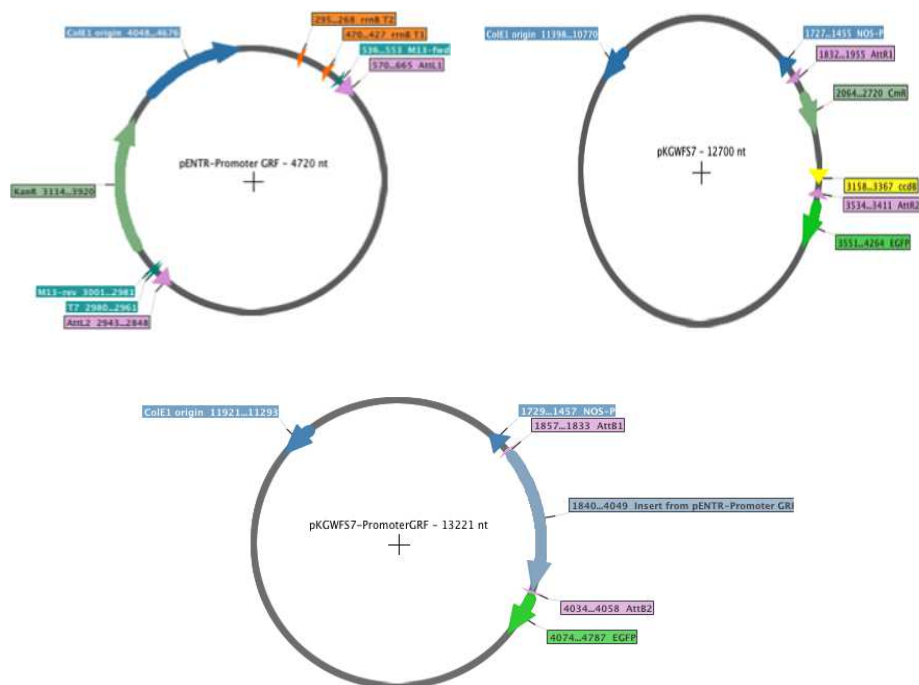


Figura 7 Esquema da reação LR para a construção Promotor::GUS, apresentada pelos mapas dos plasmídeos utilizados

Nota: Reação entre o pENTR::Promotor_GRF e pKGWFS7 resultando em pKGWFS7-Promotor_GRF::GUS.

Depois de conferido, as sequência das clonagens, e a integridade da região de interesse e o quadro de leitura na transcrição e tradução das construções. Todas as transformação foram transferidas para *Agrobacterium* 'ARqual', para os futuros trabalhos de localização da expressão com promoter-GUS e subcelular localização usando a construção GRF-NO-STOP::GFP. Todos os plasmídeos foram armazenados no congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em uma biblioteca gênica usando *E. Coli* em estoque de glicerol a 30%.

4.8 Análise Fenotípica dos mutantes

Os mutantes foram cultivados em substrato artificial Metro-Mix 360. Estacas obtidas dessas plantas foram enraizadas em vermiculita e turface na proporção de 1:1 para as análises citológicas do nódulo. Vinte e um dias após o enraizamento, as plantas foram inoculadas com rizóbio Sm1021-*lacZ*. Trinta e dois dias após a inoculação, os órgãos foram fixados e corados para as análises microscópicas.

Nos estudos histológicos, os nódulos foram fixados em solução de PIPES 0.1 M, pH = 7.2, com glutaraldeído a 2.5% por 30 minutos sob vácuo, pressão de 20 polegadas de Hg. Para coloração das bactérias com *lacZ*, os tecidos foram incubados por 16 horas com 80 mM de PIPES, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.08% X-Gal e 0.1% Tween, segundo descrito por Boivin et al. (1990) e adaptado por Pislariu e Dickstein (2007). Após a incubação, os tecidos foram clareados com solução de hipoclorito de sódio a 2.4% por 5 minutos, lavados em PIPES 0.1 M e armazenados a 4 °C. Para a emblocagem, os tecidos foram desidratados por incubação sucessiva de 45 minutos em etanol a 50%, 70%, 95% e 100%. Para transferir para parafina, os tecidos foram incubados por 15 minutos em xileno puro, 2 horas em 50% parafina/xileno a 60 °C e 2 horas ou “overnight” em 100% parafina a 60 °C. Os tecidos foram seccionados a 7 μ m de espessura em micrótomo manual. Os cortes foram espalhados em lâmina de vidro usando água na superfície e secos “overnight” a 37 °C. Para a remoção da parafina e coloração, os cortes fixados nas lâminas de vidro foram incubados duas vezes com xileno por 3 minutos, duas vezes em etanol 100% por 5 minutos, uma vez em etanol 95% por 5 minutos e, posteriormente, corou-se com floroglucinol-HCL a 1% (diluído em DNF peso/volume) para a visualização no microscópio de luz com as ampliações descritas em cada figura utilizada (JENSEN, 1962).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o Medicago Gene Expression Atlas (BENEDITO et al., 2008), o gene codificado pelo locus *Medtr7g086040* apresenta expressão específica em nódulos de fixação de nitrogênio. Esse é um gene ainda não caracterizado funcionalmente em leguminosas, o que o torna um excelente candidato para análises de sua função durante o processo de fixação simbiótica de nitrogênio.

5.1 Localização cromossômica e arquitetura gênica

O gene codificado pelo locus *Medtr7g086040* está localizado no braço maior do cromossomo 7 de *Medicago truncatula* (Figura 9). A região transcrita tem 1.4 kb, contém um único intron e codifica uma proteína de 146 aminoácidos e 17 KDa. A sequência de proteína analisada pelo site do Pfam apresentou o domínio ZF-GRF com função reconhecida e outro domínio de função desconhecida, a família DUF730, no qual o domínio sobrepõe ao domínio ZF-GRF ocupando aproximadamente 76% da proteína. O domínio conservado de Dedos de Zinco (“Zinc Finger”, ZF), PFAM 06839, é comum em fatores de transcrição e, juntamente com o tamanho pequeno da proteína, corrobora a hipótese de que o locus *Medtr7g086040* codifica um fator de transcrição. Pelo mesmo site geramos a figura 8, a qual caracteriza no domínio Dedos de Zinco os aminoácidos de maior relevância.

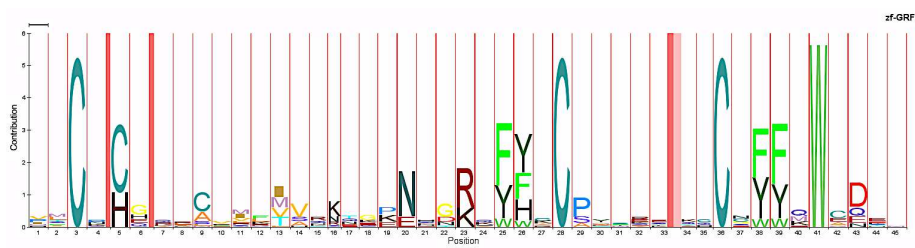


Figura 8 HMM logo do domínio de Pfam06839,

Nota: Gerado pelo site do Pfam pela metodologia de Schuster-Böckler, Schultz e Rahmann (2004).

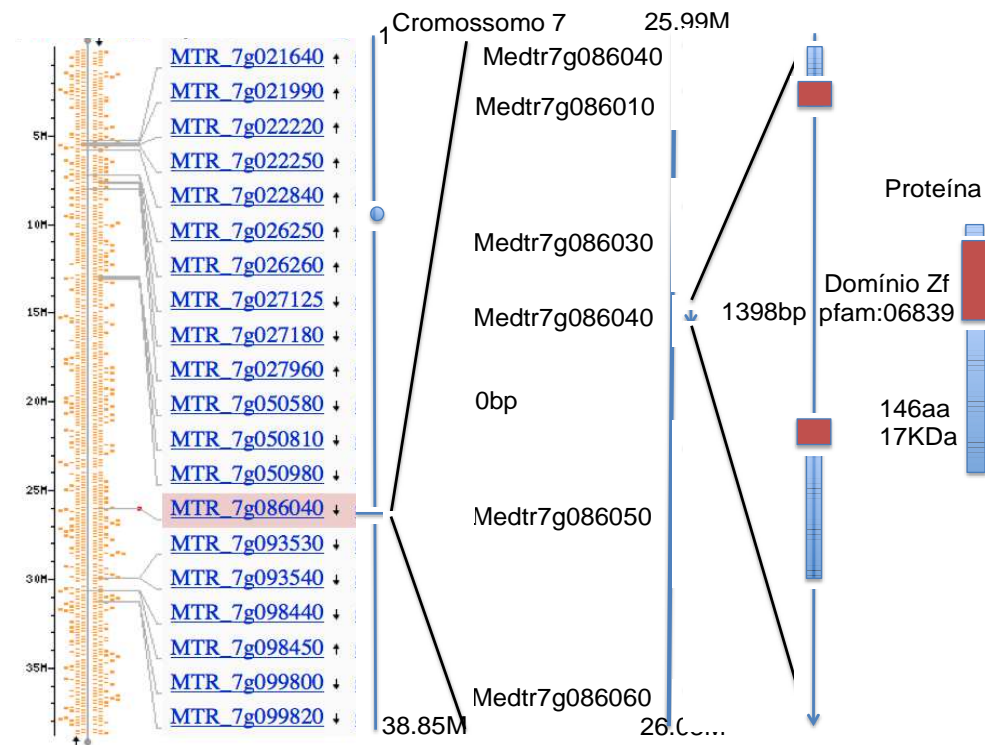


Figura 9 **Localização e arquitetura gênica**

Nota: O gene em estudo é codificado pelo locus *Medtr7g086040* no cromossomo 7 de *Medicago truncatula*. As setas indicam a orientação da transcrição. Retângulos indicam a região codante (com o domínio conservado em vermelho) e linhas representam regiões não codantes (intron e UTRs).

5.2 Análise Filogenética

Com o resultado desta primeira análise filogenética, notou-se que a proteína de interesse está localizada em um clado mais específico, figura 10, e passível de se fazer uma nova análise filogenética mais eficiente e direcionada, figura 11. As sequências foram analisadas novamente como feito anteriormente, para o alinhamento das sequências e análise filogenética, usando o método de Máxima Parcimônia na qual os valores de bootstrap foram calculados com 10000 interações pelo programa “MEGA5.2.1”, como feito anteriormente.

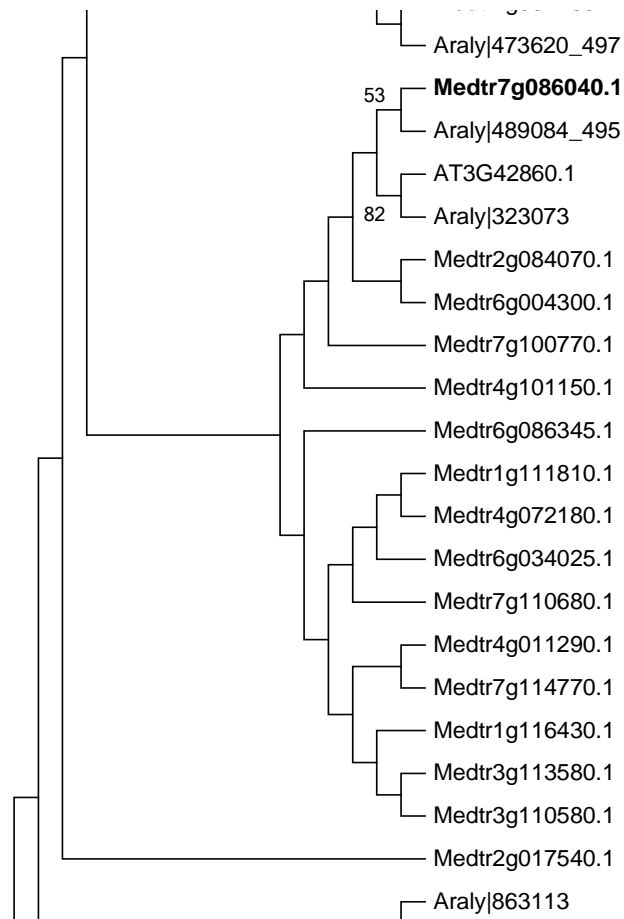


Figura 10 Imagem parcial, focada no locus em estudo, da árvore filogenética do resultado da análise filogenética, com todos os membros da família ZF-GRF de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* e *A. lyrata*

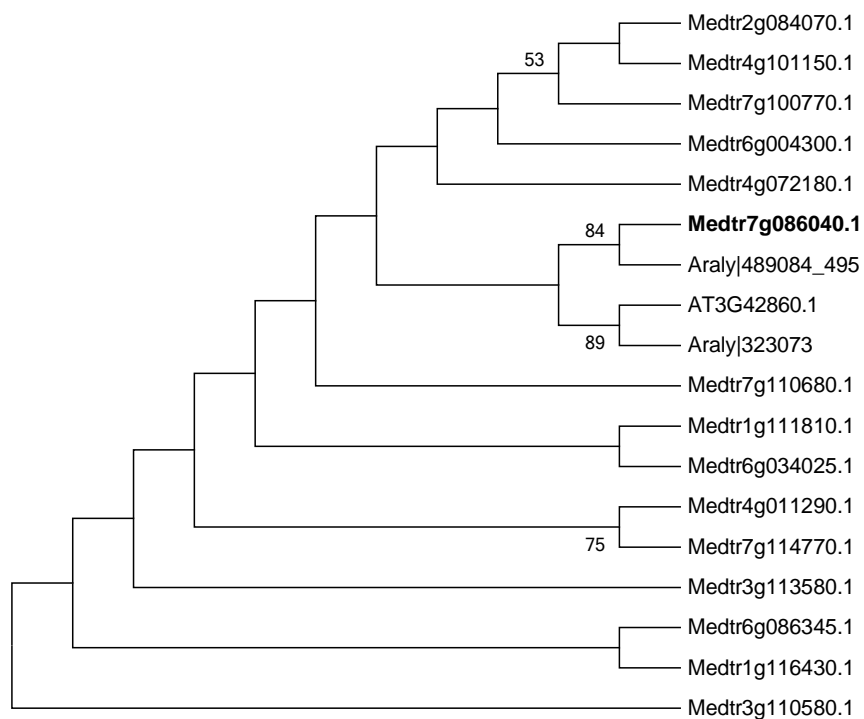


Figura 11 Árvore filogenética como resultado da filogenia gerada pelas dezoito sequências reconhecidas como maior similaridade com a proteína em estudo, do resultado da primeira análise filogenética

As análises filogenéticas revelam forte homologia entre a ZF-GRF de *Medicago truncatula* (Medtr7g086040) e proteínas funcionalmente não caracterizadas de *Arabidopsis thaliana* (AT3G42860) e seu homólogo em *A. lyrata* (Figura 11). De fato, o tamanho da proteína codificada é semelhante em *Arabidopsis*, diferindo somente em 19 amino ácidos, bem como a arquitetura gênica com apenas um intron. Da mesma forma, em ambos os genes, a região de domínio da proteína está separada pelo intron.

Nesta análise pode-se visualizar que o gene em estudo possui um ancestral comum com *A. thaliana* e dois com *A. lyrata*. Na história evolutiva

entre *Medicago* e *Arabidopsis*, ambos os grupos dividiram o mesmo ancestral comum há cerca de 64 milhões de anos (MUDGE et al., 2005).

Apresentando 84% de semelhança entre a proteína de estudo e a proteína Araly|489084_495 de *A. lyrata*, figura 11. A proteína do gene homólogo é reconhecida no site www.phytozome.net como: fgenesh2_kg.6__2218__AT1G17277.1. Os genes apresentam tamanhos semelhantes de 146 e 165 pares de bases e domínio da proteína de 47 para 40 aminoácidos, *M.truncatula* e *A.lyrata*, respectivamente.

5.3 Análise do Promotor

O padrão de expressão de um gene é coordenado pelos elementos em cis que estão especialmente localizados na região promotora do gene. Assim, uma análise dos elementos conservados no promotor de um gene pode levar ao entendimento de como o gene em estudo é regulado transcricionalmente.

A análise *in silico* da região genômica de 2.279pb imediatamente anterior ao códon de iniciação do medtr7g086040.1 conduzida pelo programa PLACE revelou um grande número de elementos regulatórios potencialmente conservados (Figura 12) e apresentados na Tabela 4.



Figura 12 Esquema da região promotora com alguns elementos marcados nas suas respectivas posições, esta figura é uma imagem das regiões reconhecidas pelo programa PLACE e marcadas manualmente em uma planilha, com o intuito de visualizar melhor como está a distribuição dos elementos

Tabela 4 Elementos encontrados na região promotora em suas respectivas posições

Elemento	Posição
DOFCOREZM	105, 130, 462, 544, 551, 748, 837, 1073, 1224, 1292, 1450, 1631, 1645, 1695, 1716, 1794, 1814, 1887, 1909 e 2111
GATABOX	86, 204, 380, 569, 640, 715, 734, 871, 1045, 1187, 1213, 1227, 1412, 1467, 1698, 1778, 2011, 2117 e 2150
CACGTGMOTIF	3, 21, 211, 564, 603, 615, 710, 742, 752, 1176, 1209, 1519, 1530, 1571, 1764, 1970 e 2098
ROOTMOTIFTAPOX1	69, 174, 273, 353, 812, 900, 910, 963, 988, 1040, 1046, 1249, 1699, 1936 e 2151
CAATBOX1	54, 436, 484, 505, 794, 851, 898, 961, 986, 1200, 1495, 1650, 2080 e 2184
IBOXCORE	86, 204, 640, 715, 871, 1187, 1227, 1412, 1467, 2111 e 2117
OSE1ROOTNODULE	105, 551, 1224, 1695, 282, 298, 704, 1677, 1996 e 2039
GTGANTG10	12, 111, 404, 779, 1819, 1848, 1944, 2143 e 2148
GT1CONSENSUS	204, 239, 640, 871, 1289, 1364, 1912 e 1919
ARR1AT	194, 405, 553, 622, 860, 1684, 1864 e 2022
WRKY71OS	13, 155, 780, 1515, 1661, 1706 e 1945
EBOXBNNAPA	3, 330, 484, 603, 1592, 1657 e 2017
MYCCONSENSUSAT	3, 330, 484, 603, 1592, 1657 e 2017
NODCON2GM	282, 298, 704, 1677, 1996 e 2039
TATABOX5	134, 1088, 1424, 1428, 1551 e 1555
POLASIG1	125, 242, 1024, 1132 e 1712

“Tabela 4, continuação”

Elemento	Posição
POLASIG2	593, 1242, 1271, 1883 e 2105
ACGTABOX	4, 157, 1115, 1116 e 1168
IBOX	715, 1187, 1412, 1467 e 2117
POLLENILELAT52	1636, 1643, 1851 e 1911
POLASIG3	65, 1129, 1854 e 1880
NODCON1GM	105, 551, 1224 e 1695
AMYBOX1	888, 241, 119 e 339
ANAERO1CONSENSUS	225, 327, 1807 e 1394
ABREATCONSENSUS	2, 3, 4 e 157
TAAAGSTKST1	104, 1694, 1886 e 1908
MARTBOX	444, 445, 1088 e 1091
MYBIAT	246, 1347, 1832 e 2013
RAV1AAT	561, 582, 585 e 2181
LECPLEACS2	1245, 1274 e 1380
MYBGAHV	88, 824 e 1119
MYBST1	639, 733 e 2116
GAREAT	88, 824 e 1119
SEF4MOTIFGM7S	148, 814 e 1420
SREATMSD	338, 538 e 1577
WBOXATNPR1	1660, 1705 e 1515
BOXIINTPATPB	4, 77 e 2072

“Tabela 4, continuação”

Elemento	Posição
DPBFCOREDCDC3	2, 3 e 563
10PEHVPSBD	1669 e 1937
NTBBF1ARROLB	616 e 1177
300ELEMENT	1288 e 1918
CCA1ATLHCB1	1135 e 1155
CURECORECR	739 e 751
GT1GMSCAM4	1289 e 1919
INRNTPSADB	1099 e 1105
TATCCAOSAMY	339 e 539
2SSEEDPROTBANAPA	1437
ASF1MOTIFCAMV	155
CANBNNAPA	1437
CARGCW8GAT	371
CCAATBOX1	1494
CIACADIANLELHC	827
CPBCSPOR	1047
EMBP1TAEM	3
GBOXLERBCS	2
GT1CORE	268
IRO2OS	3
LRENPCABE	4

“Tabela 4, conclusão”

Elemento	Posição
MYB26PS	264
MYB2AT	468
MYB2CONSENSUSAT	468
MYBCOREATCYCB1	1502
MYCATRD22	1592
PRECONSCRHSP70A	1683
PROXBBNNAPA	1437
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	1736
RBCSCONSENSUS	367
RBCSCONSENSUS	1496
REALPHALGLHCB21	247
SORLIP2AT	1506
TATABOX2	286
TATABOX3	911
TATABOXOSPAL	2055
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	339
TGACGTVMAMY	155
WBOXNTERF3	1515

A tabela 4 ilustra somente regiões regulatórias de regulação da expressão do gene possivelmente envolvido com nodulação. O presente trabalho, entretanto, não objetivou elucidar a função de tais elementos, embora

seja um tópico de bastante interesse científico no entendimento da regulação de genes envolvidos na fixação simbiótica de nitrogênio em legumes.

5.4 Perfil de expressão gênica de *Medtr7g086040.1*

De acordo com o conjunto de 234 microarranjos Affymetrix encontrado no *Medicago Gene Expression Atlas* (BENEDITO et al., 2008), o gene em estudo (probeset Mtr.14503.1.S1_at) apresenta expressão específica em nódulos de fixação de nitrogênio (Figura 12). A expressão é altamente induzida já aos 4 dias após a inoculação com rizóbio e permanece alta no nódulo maduro. Esse padrão de expressão indica uma função do produto gênico potencialmente importante na simbiose de fixação de nitrogênio, embora sua função molecular específica e seus alvos potenciais estejam indeterminados.

5.5 Identificação de mutantes insercionais para o gene em estudo

Um escrutínio de coleção de mutantes de inserção em *Medicago truncatula* (PISLARIU et al., 2012; TADEGE et al., 2008) foi conduzido e resultou na identificação de três linhagens independentes com inserções do retrotransposon *Tnt1* no locus *Medtr7g086040.1*: NF1858, NF2990 e NF3070.

5.6 Genotipagem e localização dos pontos de inserção

As linhagens e linhagens dos mutantes encontrados foram genotipadas via PCR seguido de sequenciamento do amplicon para determinação do ponto exato de inserção do retrotransposon *Tnt1* na linhagem e da segregação alélica nas linhagens. A combinação de primers GRF_fw 2 e GRF_rv_stop resultou na

amplificação de uma região genômica de 1.349 pb para o alelo selvagem (funcional, sem inserção), enquanto o alelo com inserção *Tnt1* de 5 kb (presumivelmente não-funcional) não foi amplificado nas condições experimentais utilizadas.

Para a identificação do alelo com inserção, um primer específico para o gene em estudo (GRF_fw2 ou GRF_rv_stop) e um primer anelando nas extremidades da inserção *Tnt1* [Tnt1-fw(outer) ou Tnt1-rv(outer)] foram usados. Essa última reação também permitiu identificar a orientação da inserção *Tnt1* em relação ao gene de interesse. A representação da localização da inserção do retrotransposon adquirido na análise genotípica por PCR está demonstrada na Figura 13. O tamanho dos fragmentos esperados nas análises genotípicas dos mutantes está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 Tamanho do fragmento amplificado na PCR da genotipagem dos mutantes, usando os primers GRF_fw 2 e Tnt1-fw(outer)

Linhagem Mutante	Tamanho (bp)
NF1858	862
NF2990	1391
NF3070	864

5.7 Localização dos pontos de inserção do retrotransposon

Os amplicons derivados dos alelos não-funcionais foram enviados para sequenciamento direto com o mesmo primer *Tnt1* utilizado na amplificação, para cada linhagem mutante. A análise das sequências permitiu identificar a localização exata da inserção (Figuras 13, 14 e 15). Os géis de resultados das PCRs das genotipagens e localização dos fragmentos utilizados no sequenciamento e localização da inserção do retrotransposon podem ser visualizadas nas Figuras 16 a 30.



Figura 13 Esquema do gene em estudo com a inserção do *Tnt1* na linhagem NF1858 em seus respectivos direcionamentos e proporcionalidade, no qual o gene possui 1440 pb e a inserção *Tnt1*, 5334 pb, fora da proporcionalidade.

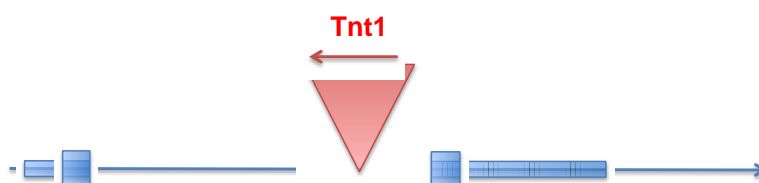


Figura 14 Esquema do gene em estudo com a inserção do *Tnt1* na linhagem NF2990 em seus respectivos direcionamentos



Figura 15 Esquema do gene em estudo com a inserção do *Tnt1* na linhagem NF3070 em seus respectivos direcionamentos

As plantas do mutante NF1858 foram genotipadas via PCR usando as combinações de primers e a metodologia apresentada, os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados da genotipagem das sub-linhagens NF1858, NF2990 e NF3070

Linagem	A	A	Genótipo
A17	+	-	AA
R108	+	-	AA
1858#3-1	-	+	aa
1858#3-3	-	+	aa
1858#3-4	-	-	--
1858#14-3	-	+	aa
1858#14-4	-	-	--
2990#19-1	-	+	aa
2990#19-2	+	+	Aa
2990#19-3	+	+	Aa
2990#19-4	-	+	aa
2990#19-5	+	-	AA
2990#21-2	+	-	AA
2990#21-3	+	-	AA
2990#21-4	+	-	AA
2990#21-5	+	-	AA
3070#10-1	-	+	AA
3070#10-2	-	+	--
3070#10-3	-	-	AA
3070#10-4	-	+	AA
3070#10-5	-	-	AA
3070#11-2	-	-	Aa
3070#11-3	-	-	Aa
3070#11-4	-	-	AA
3070#12-1	-	-	AA
3070#12-2	-	-	AA

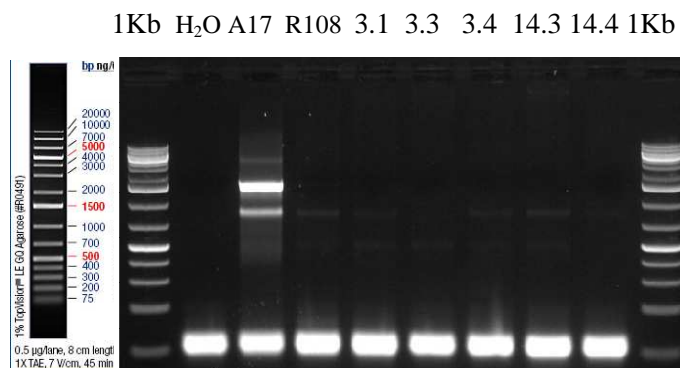


Figura 16 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRF-FW2+GRF-STOP-RV

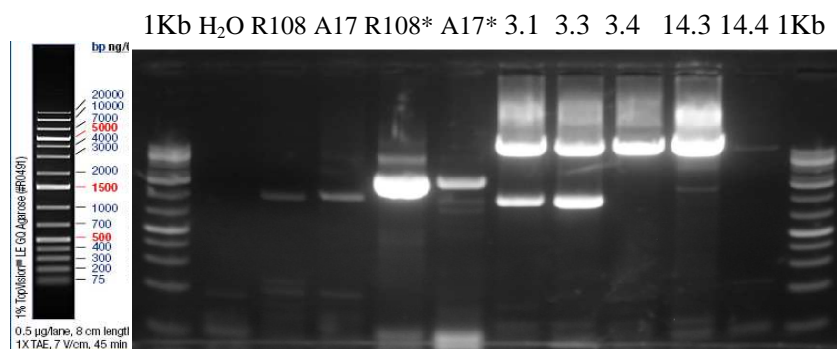


Figura 17 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFFw2 + Tnt1-fw (outer)

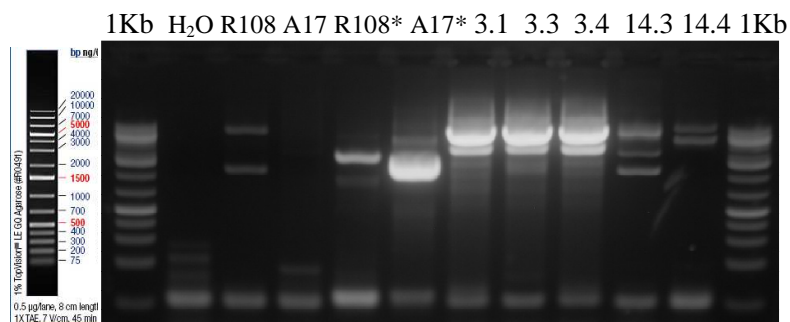


Figura 18 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFFw2 + Tnt1Rv-outer

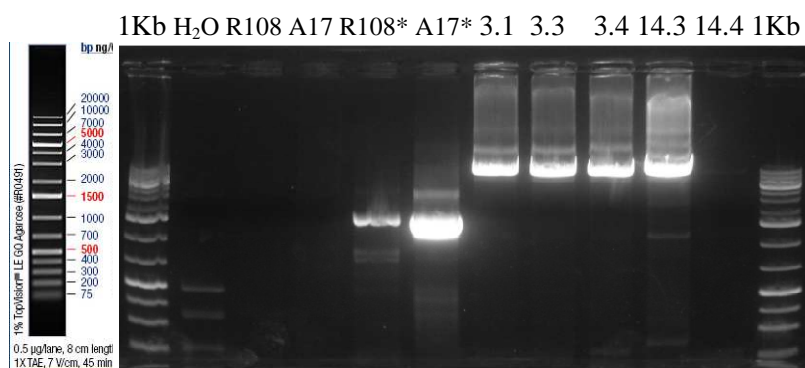


Figura 19 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFRvStop + Tnt1Fw-outer

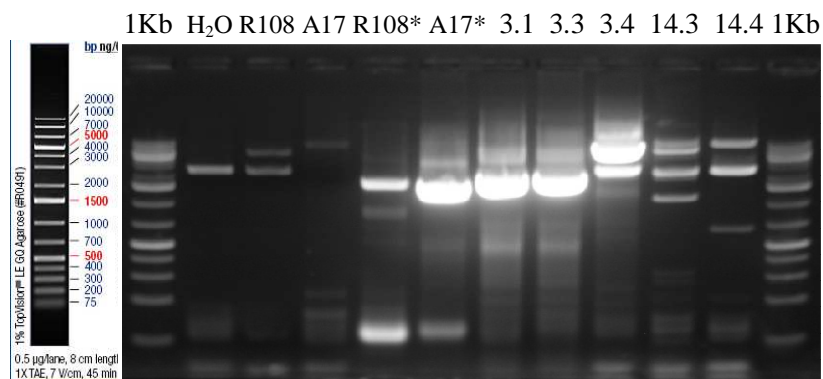


Figura 20 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF1858 com a combinação de primers GRFRvStop + Tnt1Rv-outer

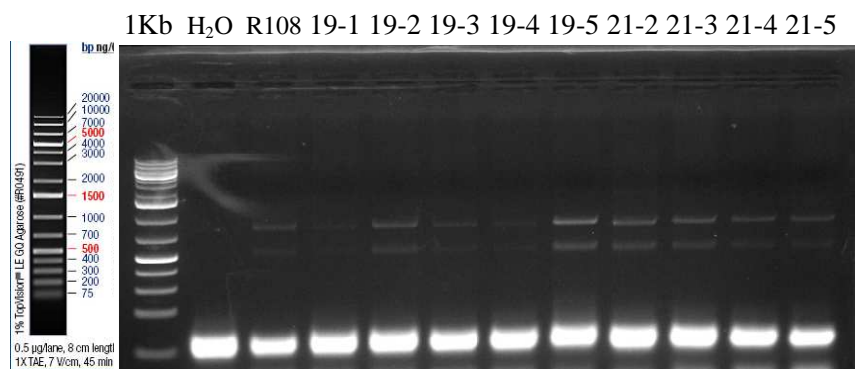


Figura 21 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + GRF-stop-rv

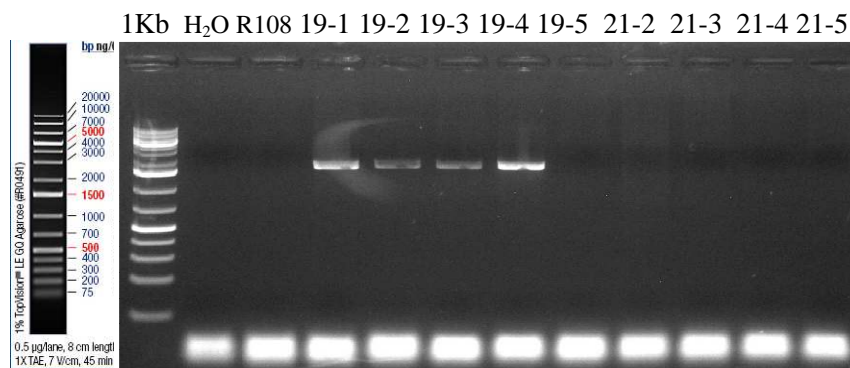


Figura 22 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Fw-outer

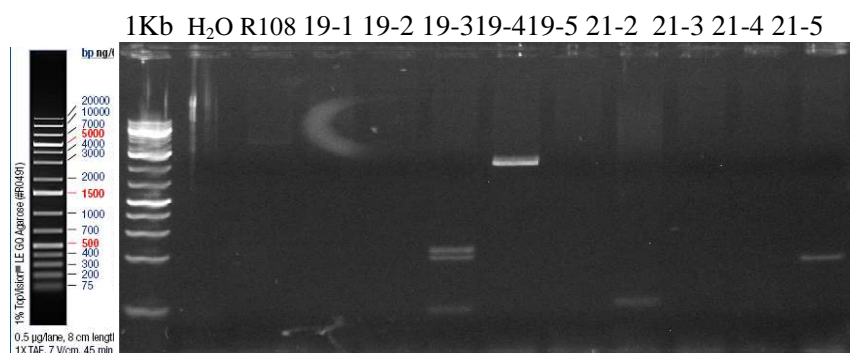


Figura 23 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Rv-outer

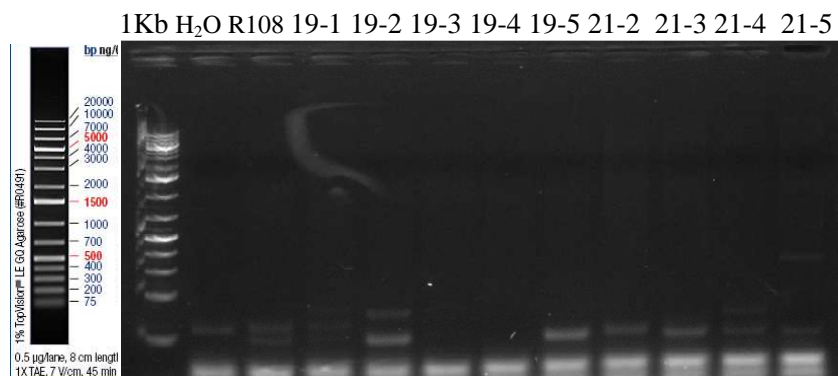


Figura 24 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-Fw-outer

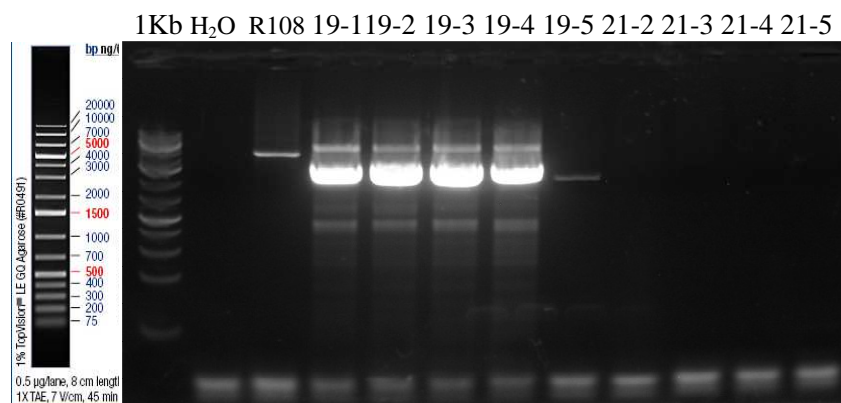


Figura 25 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF2990 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-rv-outer

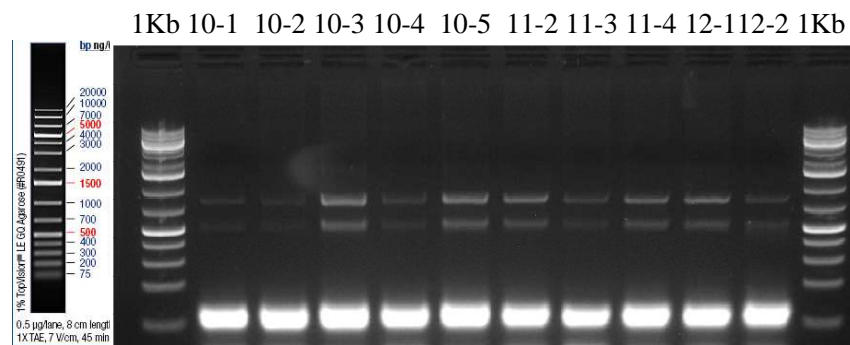


Figura 26 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + GRF-stop-rv

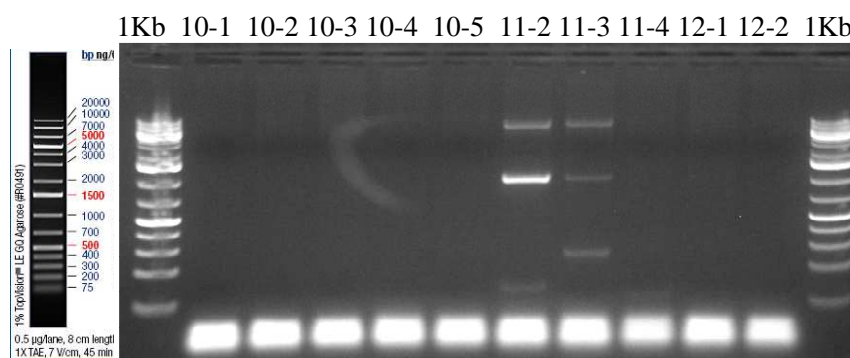


Figura 27 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Fw-outer

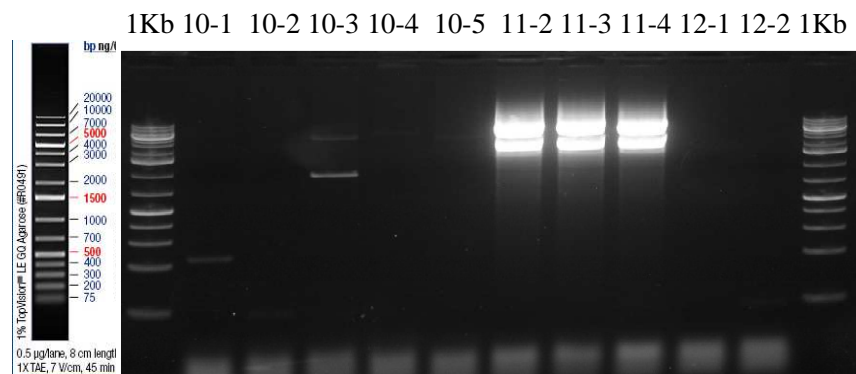


Figura 28 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-Fw-2 + Tnt1-Rv-outer

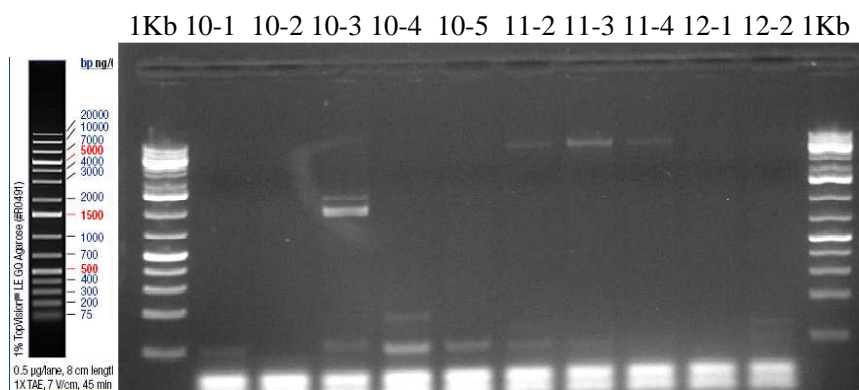


Figura 29 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-Fw-outer

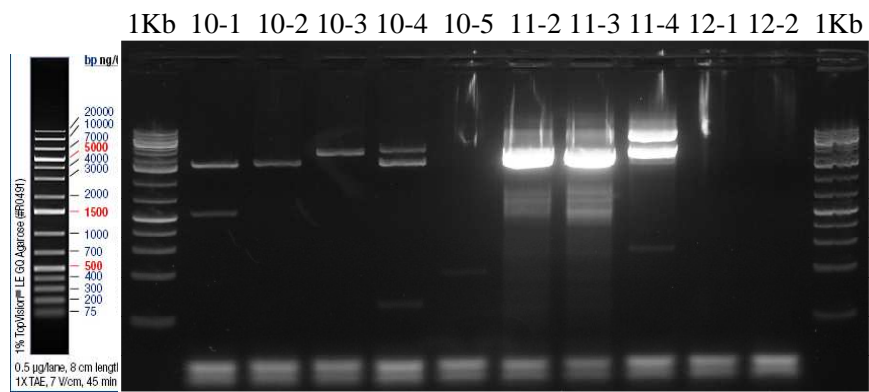


Figura 30 Gel da PCR da genotipagem das plantas da sublinhagem NF3070 com a combinação de primers GRF-stop-rv + Tnt1-rv-outer

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Tnt1-fw-outer      ACAGTGCTACCTCCTCTGGATGAATGAGACTGGAGGGGGAGATTGATGATGCCATCTCA 60
1858                -----GGRGGGGRATGATGATGCCATCTCA 26
                        ** * * .*****

Tnt1-fw-outer      TTGAAGAAGTATTAGGCATGTCCTAATAAGAGTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACCTTG 120
1858                TTGAAGAAGTATTAGGCATGTCCTAATAAGAGTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACCTTG 86
                        *****

Tnt1-fw-outer      TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCT 180
1858                TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCT 146
                        *****

Tnt1-fw-outer      TGTGAATTGTGAAAAATGTGTAAATTGCAAAATTTAGAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 240
1858                TGTGAATTGTGAAAAATGTGTAAATTGCAAAATTTAGAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 206
                        *****

Tnt1-fw-outer      TTTGGCTATAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTTCTTCACACCAACAAAGAGAGAA 300
1858                TTTGGCTATAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTTCTTCACACCAACAAAGAGAGAA 266
                        *****

Tnt1-fw-outer      AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAATAGAGAGTGAG 360
1858                AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAATAGAGAGTGAG 326
                        *****

Tnt1-fw-outer      CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAGAGGGTTATTTCTTTGAGTGTGTAGTGG 420
1858                CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAGAGGGTTATTTCTTTGAGTGTGTAGTGG 386
                        *****

Tnt1-fw-outer      TCTTTGGAGTATTTACCTCGACCTACAAGTGTAATTCCTTACTATAGTGATATCAG 480
1858                TCTTTGGAGTATTTACCTCGACCTACAAGTGTAATTCCTTACTATAGTGATATCAG 446
                        *****

Tnt1-fw-outer      TTGCTCCTCTCGGGTCGTGGTTTTTTTCCCTTATTCAGAAGGGTTTTCCACGTAAAA 540
1858                TTGCTCCTCTCGGGTCGTGGTTTTTTTCCCTTATTCAGAAGGGTTTTCCACGTAAAA 506
                        *****

Tnt1-fw-outer      TCTTGGTGTATTGTTACTCTTTTATTCTTGTAAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 600
1858                TCTTGGTGTATTGTTACTCTTTTATTCTTGTAAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 566
                        *****

Tnt1-fw-outer      TATTCGGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGGTTTATCCCAACA----- 653
1858                TATTCGGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGGTTTATCCCAACAAGGGTAA 626
                        *****

Tnt1-fw-outer      -----
1858                GGTTCTTTGTATTAATTTACCTGACCATAATATGGACATCTAAAGAAAGGCTCTATCTGGA 686

Tnt1-fw-outer      -----
1858                TTCTTTTTGTCTTGAGATGAATATGATACACTTTGCTTACAGTCGCATGTAGGAGCA 746

Tnt1-fw-outer      -----
1858                GCACTCACAGAGAAGTCATTGTTGTTTGTATTTGTATTTTGAAGAAAATATCACAT 806

```

Figura 31 Resultado do alinhamento da sequência do *Tnt1* com o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF1858#3.1

3'GGTTAGTCTCTCTATTTATATGTGATGTGATATTTTCTTCAAAAATA
 CAAAATACAAAACAACAATGACTTCTCGTGTGAGTGCTGCTCCTACA
 TGCGACTGTGAAGCAAAGTGTGTCATATTTATCTCAAGAACAAAAAA
 GAACCCAGATAGACCTTTCTTTAGGTGTCCATATTATGGTCAGGTAA
 ATTAATACAAAGAACCTTACC[3'
Tnt1(5Kb)5'GTAATTCACATTTTGAACCCATGCCATTTGGTATTTGGTT
 CATGTAAATATATTACTTTTGCTTTTAGTTTCTATAATTTTTGTTTTCG
 TCCTTGCAAATTTATATACCATAATTTATTTTCGTTCCCTCGATATTATG
 TTTCAGTTCTTGCAAATTTGTGTCATATTAGAATTAGTCTCCACAATAT
 GAAAATTTGATTTTCCTTGCTCTAATATGAGTGAAAAAATGACTAAA
 ATAAATACTGCATGAATATCATAGAACTAATATTTATAGGAATAAA
 TTTTGTAGGGATTGAAACATAAATATTGAATATATTTTTGTACCAAAA
 AAAAAACATAAATACTGCATGCATATCATAGCAACTAATGTTTGTAG
 GAATAAATTTTATAGGGATTAACAACAAAACAATAGAGACAAAAATA
 AAACAAAATATATTTAGCTAGAAGACTATAAATAAAAAATAAAAAATTT
 ACAAGACTAACAGCCAGCCTTTTCAAATAAAAAATAAAAAATTATGTT
 TGCAAGGATCAAAGTATATTTAATTAACCAGTATCTTAAGTTAATT
 AAATTAACAGTGAATTATTAATTTTTTGCTGACTATGTTGCAGATAA
 GAAAGACACATTGTGACTATTTTCATGTGGGAGGATGACTTCATTGCG
 TCCCAAGCTGCAATGGTTGAGTTGCAGGAAACCACGATTGAGAGAAA
 GATGGAAGCCATGATAATTCAAATGAATAAGGATATGAAAGCCATG
 AAAATTCAAATTAATAAGGATATGGAAGCTAAAATTAATGAATTA
 AAGAGATACGGAATACAAATTTAATATATTAGAGCGGGAAATTGAA
 GCCATGACATTCCAGATTTTCAGCAGATGTGGTAGCGTTTCGATATTAA
 GCATCTCTCTTTGGGTGGTTGAAGGGTTCGAAATGATTTTATCTTTC
 GAGTCAAGATTGAAGCTTTTCGATAGATAAGGTAGTGTGTTGATTTTAA
 GCGTCTCTCTTGGAGTTGATTTATGGAAAAAAGAAATGGGTGTCCCT
 TGTATCTTTTACGAATGGCATTCAAATCCTCTTCTTCGTAATTTTAGAT
 ATTTTGTGTGGTATTTTTTTCTTTCTTTCA**GCGGAGTACAATTGATGTA**
TTAGACTTGGATTATGTGTGTGTTTGTGTTTATAATCAAATGTTGATGT
 AAGGTTTTTTCTTGGCTAACCTTTAAAAAAAACCTCAATGTCATTACAT
 AACTT5'

Figura 32 Posição e direcionamento da inserção *Tnt1* (em vermelho) no loco *Medtr7g086040.1* do mutante NF1858

Nota: Em vermelho está representado a inserção do *Tnt1* em seu real sentido, em verde estão representado primers, os dois exons são representado de amarelo, em azul temos o stop códon, o intron e os 3'UTR e 5'UTR estão representados incolores. Sendo que as letras rosas não fazem parte do gene.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

2990 -----
Tnt1-fw-outer ACAGTGCTACCTCCTCTGGATGAATGAGACTGGAGGGGAGATTGATGATGCCATCTCA 60

2990 -----CCAACCTTG 9
Tnt1-fw-outer TTGAAGAAGTATTAGGCATGTCCTAATAAGAGTTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACCTTG 120
*****

2990 TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCTT 69
Tnt1-fw-outer TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCTT 180
*****

2990 TGTGAATTGTGAAAAATGTGTGAAATTGTCAAATATTGTAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 129
Tnt1-fw-outer TGTGAATTGTGAAAAATGTGTGAAATTGTCAAATATTGTAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 240
*****

2990 TTTGGCTATAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTCTTACACCAACAAGAGAGAAAGAA 189
Tnt1-fw-outer TTTGGCTATAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTCTTACACCAACAAGAGAGAAAGAA 300
*****

2990 AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAATAGAGAGTGAG 249
Tnt1-fw-outer AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAATAGAGAGTGAG 360
*****

2990 CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAAGAGGGTTATTTCTTTTGTAGTGTGTAGTGG 309
Tnt1-fw-outer CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAAGAGGGTTATTTCTTTTGTAGTGTGTAGTGG 420
*****

2990 TCTTTGGAGTATTTACCTCCGACCTACAAAGTGTAATAATCCTTACTATAGTGATATCAG 369
Tnt1-fw-outer TCTTTGGAGTATTTACCTCCGACCTACAAAGTGTAATAATCCTTACTATAGTGATATCAG 480
*****

2990 TTGCTCCTCTCGGGTCTGGTTTTTTTTCCCTTATTCAGAAGGGTTTTCCACGTAAAAA 429
Tnt1-fw-outer TTGCTCCTCTCGGGTCTGGTTTTTTTTCCCTTATTCAGAAGGGTTTTCCACGTAAAAA 540
*****

2990 TCTTGGTGTCATTGTTACTCTTTTATTCTTGTTAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 489
Tnt1-fw-outer TCTTGGTGTCATTGTTACTCTTTTATTCTTGTTAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 600
*****

2990 TATTCCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTTGGTAAGGGGTTTATCCCAACCTTTGAT 549
Tnt1-fw-outer TATTCCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTTGGTAAGGGGTTTATCCCAACA----- 653
*****

2990 CCTGCAACATAATTTTTATTTTTATTTTGAAGGGTGGCTGTTAGTCTTGTAAATTT 609
Tnt1-fw-outer -----

2990 TTTATTTTATTTTATAGTCTTCTAGCTAAATATATTTTGTATTTTGTCTCTATTGT 669
Tnt1-fw-outer -----

```

Figura 33 Resultado do alinhamento entre a sequência do *Tnt1* e o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF2990#19.1, GRFFw2 + Tnt1Fw-outer

3' **CGTTAGICTCTC TATTAATATGATG** **TGATATTTTCTTCA** AAAATA
 CAAAATACAAAACAACA **ATGACTTCTCGTGTGAGTGCTGCTCCTACA**
TGCGACTGTGAAGCAAAGTGTGTCATATTTATCTCAAGAACAAAAAA
GAACCCAGATAGACCTTTCTTTAGGTGTCCATATTATGGTCAG GTAA
 ATTAATACAAAGAACCTTACCGTAATTCACATTTTGAACCCATGCCAT
 TTGGTATTTGGTTCATGTAAATATATTACTTTTGCTTTTAGTTTCTATA
 ATTTTGTTCGTCCTTGCAAATTTATATACCATATTTTATTTTCGTT
 CCTCGATATTATGTTTCAGTTCCTTGCAAAATTTGTCATATTAGAATTA
 GTCTCCACAATATGAAAATTTGATTTTCTTGCTCTAATATGAGTGAA
 AAAATGACTAAAATAAATACTGCATGAATATCATAGAACTAATATT
 TATAGGAATAAATTTGTAGGGATTGAAACATAAATATTGAATATAT
 TTTTGTACCAAAAAAAAAACATAAATACTGCATGCATATCATAGCAA
 CTAATGTTTGTAGGAATAAATTTTATAGGGATTAACAAAACAATA
 GAGACAAAATAAAAACAAAATATATTTAGCTAGAAGACTATAAATA
 AAATAAAAATTTTACAAGACTAACAGCCAGCCTTTTCAAAAATAAAA
 TAAAAATTATGTTTGAAGGATCAAAG **3'Tnt1(5Kb)5'** TATATTTAATT
 AAACCAGTATCTTAAGTTAATTAATAAACAGTGAATTATTAATTTT
 TTGCTGACTATGTTGCAG **ATAAGAAAGACACATTGTGACTATTT** **CAT**
GTGGGAGGATGACTTCATTGCGTCCCAATGGTTGAGTTGCAGGAAAC
CACGATTGAGAGAAAGATGGAAGCCATGATAATTCAAATGAATAAG
GATATGAAAGCCATGAAAATTCAAATTAATAAGGATATGGAAGCTA
AAATTAATGAATTAATAAGAGATACGGAATACAAATTAATATATTA
GAGCGGAAATTGAAGCCATGACATTCCAGATTTCCAGCAGATGTGGT
AGCGTTCGATATTAAGCATCTCTCTTTG **GGTGGTTTGAAGGGTTCGAA**
ATGA TTTTATCTTTTCGAGTCAAGATTGAAGCTTTCGATAGATAAGGTA
 GTGTTTGAATTTAAGCGTCTCTCTTGGAGTTGATTTATGGAAAAAGA
 AATGGGTGTCCCTTGTATCTTTTACGAATGGCATTCAAATCCTCTTCT
 TCGTACTTTTAGATATTTTGTGTGGTATTTTTTTCTTTCTTTCA **GCGGA**
GTACAATTGATGTATTAGACTTGG ATTATGTGTGTGTTTTGTTTATAA
 TCAAATGTTGATGTAAGGTTTTTTCTTGGCTAACCTTTAAAAAAACT
 CAATGTCATTACATAACTT5'

Figura 34 Posição e direcionamento da inserção *Tnt1* (em vermelho) no loco Medtr7g086040.1 do mutante NF2990

Nota: Em vermelho está representado a inserção do *Tnt1* em seu real sentido, em verde estão representado primers, os dois exons são representado de amarelo, em azul temos o stop códon, o intron e os 3'UTR e 5'UTR estão representados incolores. Sendo que as letras em rosa não fazem parte do gene.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

3070      -----GSK-----KRRAGGGGAAATTGATGATGCCATCTCA 33
Tnt1      ACAGTGCTACCTCTGGATGAATGAGACTGGAGGGGAGATTGATGATGCCATCTCA 60
          *                               *****
3070      TTGA-GAAGTATTAGGCATGTGCCTAATAAGAGTTTTCTTTGGTTTGRWAGCCAACCTTG 92
Tnt1      TTGAAGAAGTATTAGGCATGTGCCTAATAAGAGTTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACCTTG 120
          **** *****
3070      TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCT 152
Tnt1      TTGACTTGGTTTGGTTGGTAGCCAACCTTGTGAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACCT 180
          *****
3070      TGTGAATTGTGAAAAATGTGTGTAATGTCAAATATTGTAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 212
Tnt1      TGTGAATTGTGAAAAATGTGTGTAATGTCAAATATTGTAGGCTTTAGAGGGTGAAGC 240
          *****
3070      TTTGGCTATAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTCTTCCACCAACAAGAGAGAAAGAA 272
Tnt1      TTTGGCTATAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTCTTCCACCAACAAGAGAGAAAGAA 300
          *****
3070      AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAAGAAAATAGAGAGTGAG 332
Tnt1      AGAGTGAGGTTTCACAGACAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAAGAAAATAGAGAGTGAG 360
          *****
3070      CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAGAGGGTTATTTCTTTTGTAGTGTGTAGTGG 392
Tnt1      CGATATTGTAGTGAGGTGGGAATATCAAAGAGGGTTATTTCTTTTGTAGTGTGTAGTGG 420
          *****
3070      TCTTTGGAGTATTTACCTCCGACCTACAAAGTGTAAAATTCCTTACTATAGTGATATCAG 452
Tnt1      TCTTTGGAGTATTTACCTCCGACCTACAAAGTGTAAAATTCCTTACTATAGTGATATCAG 480
          *****
3070      TTGCTCCTCTCGGGTCGTGGTTTTTTTTCCCTTATTGAGAAGGTTTTCCACGTAAAAA 512
Tnt1      TTGCTCCTCTCGGGTCGTGGTTTTTTTTCCCTTATTGAGAAGGTTTTCCACGTAAAAA 540
          *****
3070      TCTTGGTGTCATTGTTACTCTTTTATTCTTGTTAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 572
Tnt1      TCTTGGTGTCATTGTTACTCTTTTATTCTTGTTAATTACCGTATCTCGGTGCTACATTAT 600
          *****
3070      TATCCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGTTTATCCCAACAAGGGTAA 632
Tnt1      TATCCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGTTTATCCCAACA----- 653
          *****
3070      GGTTCTTTGTATTAATTTACCTGACCATAATATGGACATCTAAGAAAGGTCTATCTGGA 692
Tnt1      -----
3070      TTCTTTTTGTCTTTGARATGAAATATGATACACTTGGCTCAGTCGCATGTAGGAK 752
Tnt1      -----

```

Figura 35 Resultado do alinhamento entre a sequência do Tnt1 e o resultado do sequenciamento da banda extraída do gel de PCR da amostra NF3070#11.2, GRFFw2 + Tnt1Fw-outer

3' **CGTTAGICTCTC TATTAATATGGATG** **TGATATTTTCTTCA** AAAATA
 CAAAATACAAAACAACA **ATGACTTCTCGTGTGAGTGCTGCTCCTACA**
TGCGACTGTGAAGCAAAGTGTGTCATATTTATCTCAAGAACAAAAA
GAACCCAGATAGACCTTTCTTTAGGTGTCCATATTATGGTCAG GTAA
 ATTAATACAAAGAACCTTACCGT **3'Tnt1(5Kb)5'** AATTCACATTTTGAA
 CCCATGCCATTTGGTATTTGGTTCATGTAAATATATTACTTTTGCTTTT
 AGTTTCTATAATTTTGTTCGTCCTTGCAAATTTATATACCATATTT
 TATTTTCGTTCCCTCGATATTATGTTTCAGTTCCTTGCAAATTTGTCATA
 TTAGAATTAGTCTCCACAATATGAAAATTTGATTTTCCTTGCTCTAAT
 ATGAGTGAAAAATGACTAAAATAAATACTGCATGAATATCATAGA
 AACTAATATTTATAGGAATAAATTTGTAGGGATTGAAACATAAATA
 TTGAATATATTTTGTACCAAAAAAAAAACATAAATACTGCATGCAT
 ATCATAGCAACTAATGTTTGTAGGAATAAATTTTATAGGGATTA AAA
 CAAAACAATAGAGACAAAAATAAAACAAAATATATTTAGCTAGAAG
 ACTATAAATAAAAATAAAAATTTTACAAGACTAACAGCCAGCCTTTTC
 AAAATAAAAATAAAAATTTATGTTTGAAGGATCAAAGTATATTTAAT
 TAAACCAGTATCTTAAGTTAATTAATAAACAGTGAATTATTAATTT
 TTTGCTGACTATGTTGCAG **ATAAGAAAGACACATTGTGACTATTTTCAT**
GTGGGAGGATGACTTCATTGCGTCCCAAGCTGCAATGGTTGAGTTGC
AGGAAACCACGATTGAGAGAAAGATGGAAGCCATGATAATTCAAAT
GAATAAGGATATGAAAGCCATGAAAATTCAAATTAATAAGGATATG
GAAGCTAAAATTAATGAATTA AAAAGAGATACGGAATACAAATTA
ATATATTAGAGCGGAAATTGAAGCCATGACATTCCAGATTT CAGCA
GATGTGGTAGCGTTCGATATTAAGCATCTCTCTTTG **GGTGGTTTGAAG**
GGTTCGAAATGA ATTTTATCTTTTCGAGTCAAGATTGAAGCTTTCGATAG
 ATAAGGTAGTGTGTTGATTTAAGCGTCTCTCTTGGAGTTGATTTATGG
 AAAAAAGAAATGGGTGTCCCTTGTATCTTTTACGAATGGCATTCAA
 TCCCTCTTTCGTACTTTTAGATATTTTGTGTGGTATTTTTTTCTTTCTT
 TCA **GCGGAGTACAATTGATGTATTAGACTTGG** ATTATGTGTGTGTTTT
 GTTTATAATCAAATGTTGATGTAAGGTTTTTTCTTGGCTAACCTTTAA
 AAAAACTCAATGTCATTACATAACTT5'

Figura 36 Posição e direcionamento da inserção Tnt1 (em vermelho) no loco Medtr7g086040.1 do mutante NF3070

Nota: Em vermelho está representado a inserção do Tnt1 em seu real sentido, em verde estão representado primers, os dois exons são representado de amarelo, em azul temos o stop códon, o íntron e os 3'UTR e 5'UTR estão representados incolores. Sendo que as letras em rosa não fazem parte do gene.

5.8 Fenotipagem do mutante NF1858

Sementes da linhagem mutante NF1858 foram germinadas em placa de Petri e cultivadas em potes com turface e fertilizadas com solução nutriente B&D com baixo nitrogênio durante duas semanas. A inoculação com rizóbio Sm1021-*lacZ* foi feita após duas semanas de cultivo em turface. Nódulos foram colhidos aos 32 dias após a inoculação, período o qual se espera ter nódulos completamente desenvolvidos, para se avaliar as diferenças anatômicas do mutante em relação ao tipo selvagem, R108 (Figura 37).

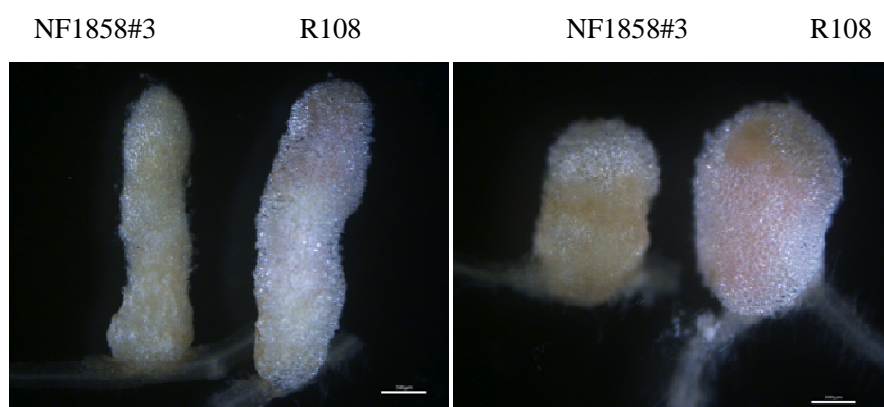


Figura 37 Foto dos nódulos do genótipo mutante, NF1858#3, (esquerda) não apresenta a coloração rosa da leg-hemoglobina, e do tipo selvagem, R108, (direita) com a coloração característica da leg-hemoglobina, indício da deficiência de fixação de nitrogênio, no mutante

Após a coloração vermelha resultante do tratamento com Red-Gal, observa-se mais claramente que as bactérias estão somente no nódulo da planta não mutante (Figura 38 a 41).



Figura 38 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e do tipo selvagem, R108 (direita) inoculados com Sm1021-lacZ após a fixação e coloração com Red-Gal

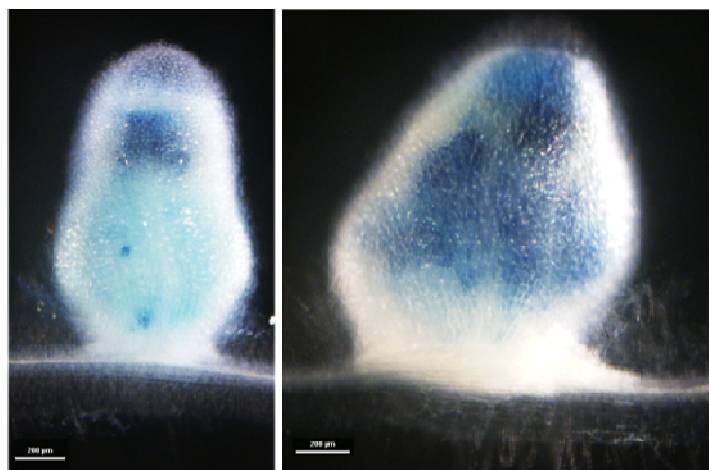


Figura 39 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e R108 (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal

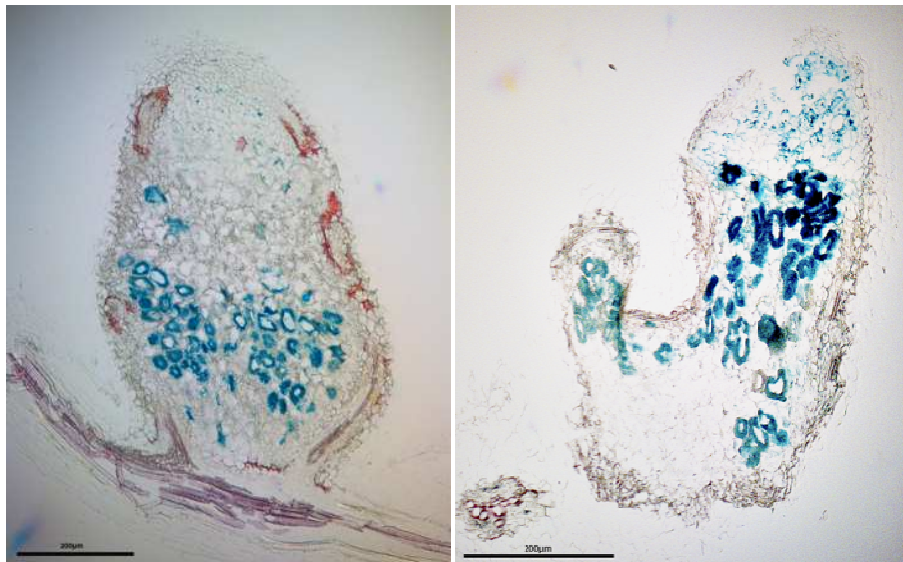


Figura 40 Foto dos nódulos do genótipo mutante NF1858#3 (esquerda) e R108 (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal e seccionamento de 7 μ m

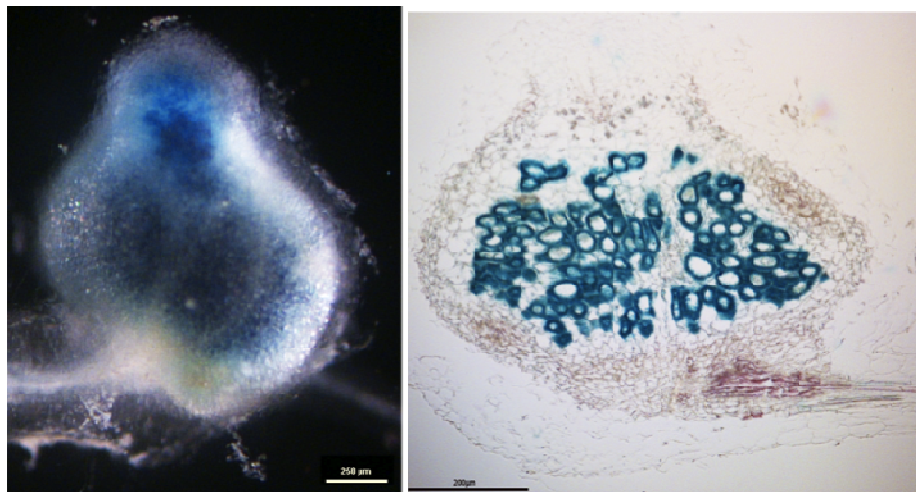


Figura 41 Foto de um nódulo do genótipo mutante complementado, NF1858#3::GRF, externa (esquerda) e interna (direita) com 32 dias após a inoculação de Sm1021-lacZ, após fixação e coloração com X-Gal e cortadas com 7 μ m

Nota: Demonstrando o resgate da função, após a complementação genética do mutante.

6 CONCLUSÕES

O gene codificado pelo locus *Medtr7g086040.1* apresenta as características de um fator de transcrição funcional: domínio ZF-GRF conservado e tamanho apropriado para adentrar o núcleo da célula vegetal e promover atividade gênica regulatória.

O padrão de expressão do gene em estudo é específico e elevado em nódulos de fixação simbiótica de nitrogênio, desde os estádios iniciais de desenvolvimento do nódulo persistindo até o nódulo maduro. Isso indica uma função importante, embora não identificada, na simbiose.

A análise de um dos mutantes insercionais no gene em estudo indica um aparente comprometimento da fixação de nitrogênio, embora não tenha afetado o desenvolvimento do nódulo. Tal padrão é compatível, por exemplo, com uma função envolvida com infecção celular pela bactéria ou mesmo com a diferenciação do bacteroide na célula já infectada, embora conclusões sobre a natureza da interação molecular do produto gênico neste momento não seja ainda possível.

7 PERSPECTIVAS

Os estudos apresentados corroboram com a hipótese de que o produto gênico codificado pelo locus *Medtr7g086040.1* é um fator de transcrição que regula os processos de fixação simbiótica de nitrogênio, embora não participe do desenvolvimento do órgão per se. Estudos adicionais são necessários para a completa caracterização da função molecular desse gene, especialmente para responder às seguintes perguntas:

- 1) O produto gênico em estudo é de fato um fator de transcrição funcional?

Para responder essa pergunta, será necessário caracterizar a localização do produto gênico. Estudos de microscopia confocal com nódulos expressando o produto gênico fusionado com uma proteína fluorescente contribuirão para avaliar se o produto gênico de fato se localiza no núcleo. Ademais, estudos de afinidade do fator de transcrição putativo com elementos regulatórios no DNA de *Medicago truncatula* (imunoprecipitação de cromatina, por exemplo) deverão revelar quais os elementos reguladores com afinidade para o produto gênico em estudo.

- 2) O homólogo de *Medtr7g086040.1* em Arabidopsis é um homólogo funcional?

A história evolutiva da proteína em estudo é fascinante. Mesmo que seja expresso em um órgão de legume sem homologia com um órgão de Arabidopsis (o nódulo), a sequência mais próxima ao produto gênico codificado pelo locus *Medtr7g086040.1* é uma proteína de Arabidopsis (At3g42860.1). Isso merece mais estudos: será que o At3g42860.1 pode complementar o mutante ZF-GRF do nódulo de *Medicago*? Qual o padrão de expressão e função do gene

At3g42860.1, até agora não caracterizado funcionalmente? Essa análise pode revelar não apenas a história evolutiva dessa família gênica, mas mais importante é o potencial de se revelar a evolução da fixação simbiótica de nitrogênio em nódulos de leguminosas a partir do empréstimo de funções moleculares já inventadas desde o último ancestral comum entre as leguminosas e crucíferas.

3) Quais fatores de transcrição regulam a transcrição do locus *Medtr7g086040.1*?

Uma pergunta importante é em relação aos reguladores da expressão do gene em estudo. Assim, o estudo *in silico* da rede de regulação gênica e o aprofundamento nos elementos funcionais regulatórios no promotor do gene em estudo poderá revelar os elementos em *trans* que controlam sua expressão.

4) Qual o domínio de expressão exato de *Medtr7g086040.1*?

Até o momento, se sabe que o gene é expresso especificamente em nódulos, desde o início do desenvolvimento, embora não esteja diretamente ligado ao desenvolvimento do órgão, mas atue funcionalmente na fixação biológica de nitrogênio. A análise da expressão do gene marcador GUS fusionado com o promotor do gene em estudo elucidará os domínios exatos de expressão, tanto temporalmente quando dentro do órgão.

5) Qual a função molecular de *Medtr7g086040.1*?

Baseado no seu padrão de expressão preciso, o estudo mais detalhados dos fenótipos dos mutantes (por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão dos tecidos do nódulo), na localização subcelular do produto gênico, na demonstração de afinidade com elementos reguladores de DNA específicos, poder-se-á demonstrar a função exata coordenada por este fator de transcrição

putativo e quais os genes regulados por ele, bem como os elementos que o regulam.

REFERÊNCIAS

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation.** Wisconsin: The University of Wisconsin, 1981. 821 p.

ANDRIANKAJA, A. et al. AP2-ERF transcription factors mediate nod factor-dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 9, p. 2866-2885, Sept. 2007.

ANÉ, J. M. et al. Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 11, p. 1108-1118, 2002.

ASAMIZU, E. et al. A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 4, p. 2030-2040, Aug. 2008.

BAIER, M. C. et al. Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, n. 4, p. 1600-1618, Dec. 2007.

BARKER, D. G. et al. Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. In: THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION. **Medicago truncatula handbook**. Ardmore, 2006. Disponível em: <<http://www.noble.org/medicagohandbook>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

_____. *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 8, n. 1, p. 40-48, 1990.

BAR SOMIAN, G. D. et al. *Rhizobium meliloti* mutants unable to synthesize anthranilate display a novel symbiotic phenotype. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 13, p. 4416-4426, July 1992.

BENABEN, V. et al. TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 107, n. 1, p. 53-62, Jan. 1995.

BENEDITO, V. A. et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 504-513, Aug. 2008.

BIOINFORMATICS LABORATORY. Plant Biology Division. **IMGAG and Geneindex**. Disponível em: <<http://bioinfo3.noble.org/getseq/>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BOIVIN, C. et al. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 1157-1170, Dec. 1990.

BOUALEM, A. et al. MicroRNA166 controls root nodule development in *Medicago truncatula*. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 5, p. 876-887, June 2008.

BOURCY, M. et al. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD- containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. **New Phytologist**, Cambridge, v. 197, n. 4, p. 1250-1261, Mar. 2013.

BRIGHT, L. J. et al. The LATD gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 6, p. 521-532, June 2005.

BRUIJN, F. J. de et al. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 1673-1682, 1989.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society Plant Physiologists, 2000. 1408 p.

CATALANO, C. M. et al. *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules. **Planta**, Berlin, v. 225, n. 3, p. 541-550, Feb. 2007.

CATALANO, C. M.; LANE, W. S.; SHERRIER, D. J. Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 3, p. 519-531, Feb. 2004.

COMBIER, J. P. et al. The MtMMPL1 early nodulin is a novel member of the matrix metalloendoproteinase family with a role in *Medicago truncatula* infection by *Sinorhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 144, n. 2, p. 703-716, June 2007.

COOK, D. et al. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 1, p. 43-55, Jan. 1995.

CORDOBA, E. et al. Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1037-1049, Mar. 2003.

CRESPI, M.; GÁLVEZ, S. Molecular mechanisms in root nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 155-166, June 2000.

DAY, D. A.; COPELAND, L. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 29, n. 2, p. 185-201, 1991.

DICKSTEIN, R. et al. ENOD8, a novel early nodule-specific gene, is expressed in empty alfalfa nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 6, p. 715-721, Nov./Dec. 1993.

DOYLE, J. J. et al. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of modulation. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, n. 4, p. 541-554, Apr. 1997.

DUCZEKT, L. J.; BUCHAN, J. A. The effect of captan seed treatment on emergence, nodulation, seed yield and seed protein content of lentils. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 61, p. 727-730, 1981.

EDWARDS, D.; MURRAY, J. A.; SMITH, A. G. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, n. 3, p. 1015-1022, July 1998.

EINSLE, O. et al. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-Cofactor. **Science**, New York, v. 297, n. 5587, p. 1696-1700, Sept. 2002.

ERFURTH, I. d' et al. Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Journal**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 95-106, Apr. 2003.

ESCUREDO, P. R. et al. Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, n. 4, p. 1187-1195, Apr. 1996.

FARIA, S. M. de et al. Occurrence of nodulation in the leguminosae. **New Phytologist**, Cambridge, v. 111, p. 607-619, 1989.

FELLE, H. H. et al. Elevation of the cytosolic free $[Ca^{2+}]$ is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, n. 1, p. 273-279, Sept. 1999.

FRUGIER, F. et al. A Kruppel-like zinc-finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 4, p. 475-482, Feb. 2000.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 68, n. 2, p. 280-300, June 2004.

GALVEZ, L.; GONZALEZ, E. M.; ARRESE-IGOR, C. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. **Journal of Experimental Botany**, Elmsford, v. 56, n. 419, p. 2551-2561, Sept. 2005.

GAMAS, P.; BILLY, F. de; TRUCHET, G. Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 5, p. 393-403, May 1998.

GAMAS, P. et al. Use of a substrate hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, n. 4, p. 233-242, May 1996.

GARCIA, J.; BARKER, D. G.; JOURNET, E. P. Seed storage and germination. In: THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION. **Medicago truncatula handbook**. Ardmore, 2006. Disponível em: <http://www.noble.org/medicagohandbook>. Acesso em: 10 mar. 2013.

GEURTS, R.; BISSELING, T. Rhizobium Nod factor perception and signalling. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. S239-S249, 2002. Supplement.

GIMENEZ-IBANEZ, S. et al. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. **Current Biology**, London, v. 19, n. 5, p. 423-429, Feb. 2009.

GOEHRE, V. et al. Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. **Current Biology**, London, v. 18, n. 23, p. 1824-1832, Dec. 2008.

GONZALEZ-SAMA, A. et al. Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 2, p. 173-180, Feb. 2006.

GOODSTEIN, D. M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 22, p. D1178-D1186, Nov. 2012.

GORDON, A. J. et al. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 120, n. 3, p. 867-878, July 1999.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, p. 872-877, Mar. 2003.

GREENE, E. A. et al. MtENOD16 and 20 are members of a family of phytocyanin-related early nodulins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 36, n. 5, p. 775-783, Mar. 1998.

GRONLUND, M. et al. The Lotus japonicus ndx gene family is involved in

nodule function and maintenance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, n. 2, p. 303-316, May 2003.

HAEZE, W. d'; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 79R-105R, Mar. 2002.

HIGO, K. et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 297-300, 1999.

HIRSCH, S. et al. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 2, p. 545-557, Feb. 2009.

HIRSCH, S.; OLDROYD, G. E. D. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 4, n. 8, p. 698-700, 2009.

HOHNJEC, N. et al. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 16, n. 10, p. 903-915, Oct. 2003.

HOLSTERS, M. et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 163, p. 181-187, 1978.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. Berkeley: University of California, 1962. 408 p.

JOINT GEONME INSTITUTE. **Species in Phytozome v9.1**. Disponível em: <<http://phytozome.net>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

JOURNET, E. P. et al. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPR encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 6, p. 737-748, June 2001.

_____. Rhizobial inoculation and nodulation of *Medicago truncatula*. In: THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION. **Medicago truncatula handbook**. Ardmore, 2006. Disponível em: <<http://www.noble.org/medicagohandbook>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

_____. Rhizobium meliloti Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 241-249, Aug. 1994.

JYOTHISHWARAN, G. et al. A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Science**, Columbus, v. 93, n. 6, p. 770-772, 2007.

KALÓ, P. et al. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. **Science**, New York, v. 308, n. 5729, p. 1786-1789, June 2005.

KISS, E. et al. LIN, a novel type of U-Box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 151, n. 3, p. 1239-1249, Nov. 2009.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 32, p. 87-100, 1985.

KRUSELL, L. et al. The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 5, p. 1625-1636, May 2005.

KUPPUSAMY, K. T. et al. LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, n. 3, p. 3682-3691, Nov. 2004.

LAVIN, M.; HERENDEEN, P. S.; WOJCIECHOWSKI, M. F. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. **Systematic Biology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 575-594, Aug. 2005.

LIANG, Y.; MITCHELL, D. M.; HARRIS, J. M. Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula latd* mutant. **Developmental Biology**, San Diego, v. 304, n. 1, p. 297-307, Apr. 2007.

LIMPENS, E. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. **Science**, New York, v. 302, n. 5645, p. 630-633, Oct. 2003.

MARSH, J. F. et al. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 144, n. 1, p. 324-335, May 2007.

MATHIS, R. et al. The early nodulin gene MtN6 is a novel marker for events preceding infection of *Medicago truncatula* roots by *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 6, p. 544-555, June 1999.

MOCHIDA, K. et al. LegumeTFDB: an integrative database of *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* transcription factors. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 290-291, 2010.

MUDGE, J. et al. Highly syntenic regions in the genomes of *soybean*, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, London, v. 5, p. 15-20, Aug. 2005.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 566-576, July 2004.

OLDROYD, G. E. D. et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 45, p. 119-144, 2011.

PISLARIU, C. I.; DICKSTEIN, R. An IRE-like AGC kinase gene, MtIRE, has unique expression in the invasion zone of developing root nodules in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 144, p. 682-694, 2007.

PISLARIU, C. I. et al. A *Medicago truncatula* tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 159, n. 2, p. 1686-1699, June 2012.

PLET, J. et al. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 622-633, Feb. 2011.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**: part 1. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 1-26.

PRESTRIDGE, D. S. Signal scan: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. **Computer Applications in the Biosciences**, Liverpool, v. 7, n. 2, p. 203-206, Apr. 1991.

PRINGLE, D.; DICKSTEIN, R. Purification of ENOD8 proteins from *Medicago sativa* root nodules and their characterization as esterases. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v. 42, n. 1, p. 73-79, Jan. 2004.

PUPPO, A. et al. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, n. 3, p. 683-701, Mar. 2005.

RIVAL, P. et al. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. **Development**, Cambridge, v. 139, n. 18, p. 3383-3391, Sept. 2012.

SCHAUSER, L. et al. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 191-195, Nov. 1999.

SCHNABEL, E. et al. The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, n. 5, p. 809-822, Aug. 2005.

SCHUSTER-BÖCKLER, B.; SCHULTZ, J.; RAHMANN, S. HMM logos for visualization of protein families. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, n. 5, p. 1-8, Jan. 2004.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **The Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 78, p. 701-722, Feb. 2009.

SHEOKAND, S.; DHANDI, S.; SWARAJ, K. Studies on nodule functioning and hydrogen peroxide scavenging enzymes under salt stress in chickpea nodules. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 33, n. 5, p. 561-566, Sept./Oct. 1995.

SHI, L. et al. Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 8, p. 1339-1356, Aug. 1997.

SHIMOMURA, K. et al. LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 11, p. 1572-1581, Oct. 2006.

SILVENTE, S. et al. Evidence for sugar signalling in the regulation of asparagine synthetase gene expressed in *Phaseolus vulgaris* roots and nodules. **Journal of Experimental Botany**, Columbus, v. 59, n. 6, p. 1279-1294, Apr. 2008.

SMIT, P. et al. Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, n. 1, p. 183-191, June 2007.

_____. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. **Science**, New York, v. 308, n. 5729, p. 1789-1791, June 2005.

SPENT, J. I. 60Ma of legume nodulation: what's new? what's changing? **Journal of Experimental Botany**, Columbus, v. 59, n. 5, p. 1081-1084, 2008.

_____. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 174, n. 1, p. 11-25, Apr. 2007.

STARKER, C. G. et al. Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 140, n. 2, p. 671-680, Feb. 2006.

SWARAJ, K. et al. Dark-induced changes in legume nodule functioning. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 6, p. 429-438, 2001.

TADEGE, M. Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 335-347, Jan. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEILLET, A. et al. Api, a novel *Medicago truncatula* symbiotic mutant impaired in nodule primordium invasion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 5, p. 535-546, May 2008.

TRANSCRIPT details: Mtr.14503.1.S1_at L T. Disponível em:
<http://mtgea.noble.org/v3/probeset.php?id=Mtr.14503.1.S1_at&print=true>.
Acesso em: 10 mar. 2013.

TRINICK, M. J. Biology. In: BROUGHTON, W. J. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon, 1982. p. 77-146.

UDVARDI, M. K.; DAY, D. A. Ammonia (^{14}C -methylamine) transport across the bacteroid and peribacteroid membranes of soybean root nodules. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, n. 1, p. 71-76, Sept. 1990.

_____. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 493-523, 1997.

UMN MEDICAGO RESOURCES. *Medicago truncatula*: a model for legume research. Disponível em: <<http://www.medicago.org>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

VALENTINE, A. J.; BENEDITO, V. A.; KANG, Y. Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. In: FOYER, C.; ZHANG, H. (Ed.). **Nitrogen metabolism in plants in the post-genomic Era**. Cambridge: Wiley-Blackwell, 2011. p. 207-248. (Annual Plant Reviews, 42).

VEERESHILINGAM, H. et al. Nip, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, n. 3, p. 3692-3702, Oct. 2004.

VELDE, W. van de et al. Aging in legume symbiosis: a molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, n. 2, p. 711-720, Apr. 2006.

WAN, X. et al. *Medicago truncatula* ENOD40-1 and ENOD40-2 are both involved in nodule initiation and bacteroid development. **Journal of Experimental Botany**, Columbus, v. 58, n. 8, p. 2033-2041, Apr. 2007.

YANO, K. et al. New nodulation mutants responsible for infection thread development in *Lotus japonicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 7, p. 801-810, July 2006.

YOUNG, N. D. et al. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbiosis. **Nature**, London, v. 480, p. 520-524, Dec. 2011.