

## SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

### **EXPRESSÃO DOS GENES *nod* DE *Rhizobium tropici*, *R. etli* E *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* E ESTABELECIMENTO DA NODULAÇÃO DO FEIJOEIRO NA PRESENÇA DE EXSUDATOS DE SEMENTES DE *Mimosa flocculosa* E *Leucaena leucocephala*<sup>(1)</sup>**

F. M. MERCANTE<sup>(2)</sup> & A. A. FRANCO<sup>(3)</sup>

#### RESUMO

Na etapa inicial da troca de sinais moleculares entre macro e microssimbiontes, a interação do feijoeiro e estirpes de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* foi avaliada pela expressão dos genes *nod* de estirpes bacterianas, contendo a fusão *nodA::gusA*. Esta avaliação foi efetuada por meio da atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, utilizando, como indutores, exsudatos liberados pelas sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. Além disso, avaliou-se o efeito da adição desses exsudatos no estabelecimento da nodulação do feijoeiro, cv. Carioca. Nos testes "in vitro", a mistura de exsudatos de sementes de feijoeiro e *M. flocculosa* promoveu aumentos sinérgicos significativos na expressão dos genes *nod*, tanto das estirpes de *R. tropici* (CIAT 899/pGUS 32 e F 98.5/pGUS 32) quanto de *R. etli* (CFN 42/pGUS 32). Em condições controladas, a adição dos exsudatos, tanto de *M. flocculosa* quanto de *L. leucocephala*, proporcionou aumento significativo na nodulação inicial do feijoeiro, quando foi inoculada a estirpe CFN 42 (*R. etli*). A nodulação do feijoeiro cultivado em vasos com solo não foi inibida pelo suprimento de N-mineral, quando se inoculou a estirpe CIAT 899 (*R. tropici*) e foram fornecidos exsudatos de sementes de *M. flocculosa*.

**Termos de indexação:** *Phaseolus vulgaris*, genes *nod*,  $\beta$ -glucuronidase, simbiose, sinais moleculares.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Recebido para publicação em fevereiro de 1999 e aprovado em abril de 2000.

<sup>(2)</sup> Pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, Km 253, Caixa Postal 661, CEP 79804-970 Dourados (MS). E-mail: mercante@cpao.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. Km 47, Ant. Rodovia Rio-São Paulo, CEP 23851-970 Seropédica (RJ). E-mail: avilio@cnpab.embrapa.br

**SUMMARY:** *EXPRESSION OF nod GENES IN Rhizobium tropici, R. etli, R. leguminosarum bv. phaseoli AND BEAN NODULATION IN THE PRESENCE OF Mimosa flocculosa AND Leucaena leucocephala SEED EXUDATES*

*The first steps of molecular signal exchange between the bean plant and its Rhizobium spp. microsymbionts were studied. The effects on nodulation of the addition of seed exudates of two different leguminous tree plants, Mimosa flocculosa or Leucaena leucocephala, in the presence of R. tropici, R. etli or R. leguminosarum bv. phaseoli were studied. The expression of nod genes was also measured "in vitro" by the activity of  $\beta$ -glucuronidase on different genetically modified strains possessing the fusion nodA::gusA, using as inducers seed exudates from both leguminous trees. In general, a very complex interaction among the different inducers was observed. Seed exudates, both from Mimosa and Leucaena, led to a significant raise on initial nodulation of the bean plant when inoculated with the strain of R. etli CFN 42 but not when inoculated with R. tropici or R. leguminosarum bv. phaseoli. Mixed beans and Mimosa seed exudates presented a synergistic effect on the expression of nod genes, measured by the activity of  $\beta$ -glucuronidase, on strains of R. tropici (CIAT 899/pGUS 32, F 98.5/pGUS 32) and R. etli (CFN 42/pGUS 32). The addition of nitrogen did decrease common bean nodulation except when the plants were inoculated with the strain CIAT 899 (R. tropici) and supplied with seed exudates from M. flocculosa.*

*Index terms:* Phaseolus vulgaris, nod genes, molecular signals,  $\beta$ -glucuronidase, symbiosis.

## INTRODUÇÃO

A associação simbiótica entre estirpes de *Rhizobium* e espécies de leguminosas resulta de um processo complexo, que envolve a expressão de genes simbióticos de ambos os parceiros. Nesse contexto, a coordenação das diversas etapas da formação dos nódulos radiculares em leguminosas ocorre por uma intensiva troca de sinais moleculares entre a planta e a bactéria.

Na etapa inicial desta comunicação molecular entre macro e microssimbiontes, as plantas hospedeiras exsudam substâncias, incluindo-se carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides, isoflavonóides e outros – chamados, coletivamente, no presente trabalho, de flavonóides), que atuam não apenas como quimio-atraentes para a bactéria, mas também como indutores dos genes da nodulação-*nod* e *nol*, coletivamente denominados genes *nod* do rizóbio (Firmin et al., 1986; Peters et al., 1986; Redmond et al., 1986; Krishnan et al., 1995). Uma vez ativos, esses genes da nodulação promovem no microssimbionte a síntese de outros sinais, chamados "fatores Nod" e identificados como lipooligossacarídeos, também denominados oligossacarídeos lipoquitínicos (Lerouge et al., 1990; Schultze et al., 1994; López-Lara et al., 1995). Esses sinais da bactéria produzidos em resposta aos indutores presentes nas sementes e raízes das espécies são responsáveis pelas alterações morfológicas nas raízes, durante o estágio da pré-infecção, como o encurvamento do pêlo

radicular, a divisão das células corticais e a indução do meristema do nódulo (Lerouge et al., 1990; Spaink et al., 1991; Truchet et al., 1991; Schultze et al., 1992; van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Após estas etapas iniciais, as bactérias aderem-se aos pêlos radiculares, penetram na raiz do hospedeiro e inicia-se a formação do nódulo (Hungria, 1994; van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

As proteínas NodD atuam, pois, como ativadores transcricionais, que se ligam ao gene "*nod box*", uma seqüência de nucleotídeos presente no promotor dos genes *nod*, sendo induzíveis pelos exsudatos das plantas (Kondorosi, 1992). Assim, a ativação da expressão do gene *nod* pelas proteínas NodD requer a presença de compostos liberados nos exsudatos das plantas (Long, 1989). Essas moléculas indutoras são muito ativas, mesmo em baixas concentrações, e podem estimular a expressão do gene *nod* em poucos minutos de exposição (Djordjevic et al., 1987; Zaat et al., 1987).

Contudo, as interações dos flavonóides da planta hospedeira e a proteína NodD do microssimbionte parecem muito mais complexas do que a simples ativação dos genes *nod*. Tem sido demonstrado que os compostos fenólicos presentes nos exsudatos de plantas leguminosas também podem atuar como inibidores da transcrição dos genes *nod*, sugerindo que a ativação desses genes seja determinada pela relação entre os compostos indutores e os inibidores (Djordjevic et al., 1987). Segundo Hartwig et al. (1989), a presença de concentrações subótimas de diferentes indutores pode resultar num aumento

sinérgico na expressão do gene *nod*. Neste sentido, Hungria et al. (1992) observaram um aumento na transcrição dos genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pela ação sinérgica entre a malvidina (3,5,7,4'-tetra-hidróxi-3',5'-di-metóxi-flavilium), principal indutor das sementes de feijão, e a genisteína, indutor mais ativo das raízes.

Dentro deste contexto, o conhecimento da interação dos diferentes compostos indutores dos genes da nodulação do rizóbio, presentes em exsudatos de sementes e raízes de leguminosas, representa uma ferramenta importante nos estudos da interação planta-rizóbio.

Outro aspecto a ser considerado nos estudos da interação simbiótica entre estirpes de *Rhizobium* e o feijoeiro refere-se ao efeito do excesso de nitrogênio combinado, que, freqüentemente, limita o potencial de nodulação e fixação de N<sub>2</sub>. De maneira geral, o nitrogênio mineral influi, em diferentes magnitudes, na interação rizóbio-leguminosa, como, por exemplo, no controle da produção de flavonóides pela planta e na adesão da bactéria às raízes, além de influenciar o processo de infecção, desenvolvimento nodular e atividade da nitrogenase (Streeter, 1988). Contudo, os mecanismos pelos quais o nitrogênio combinado limita a nodulação ainda não são bem conhecidos. Em *Rhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum*, verificou-se que o efeito inibitório do nitrogênio combinado na nodulação estava relacionado com a inibição da expressão dos genes *nodABC* do rizóbio (Dusha et al., 1989; Wang & Stacey, 1990). Por outro lado, resultados experimentais obtidos por Mercante et al. (1995) demonstraram que a presença de N-mineral no momento da indução não inibiu a expressão dos genes *nodABC* de estirpes de *R. tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, embora a nodulação de dois cultivares de feijoeiro tenha sido inibida, mesmo em níveis baixos de nitrogênio adicionados.

Assim, este trabalho teve como objetivos: (a) avaliar a expressão dos genes *nod* de estirpes de rizóbio pertencentes às diferentes espécies simbiontes do feijoeiro, na presença de exsudatos liberados pelas sementes de feijoeiro, *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*, e (b) avaliar os efeitos na nodulação do feijoeiro, pela adição de exsudatos de sementes de *M. flocculosa* ou *L. leucocephala* no plantio de feijoeiro, inoculado com estirpes de *R. tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e, ou, suprido com nitrogênio mineral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos exsudatos de sementes

As sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala* (var. K-72) foram escarificadas (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, por 5 e 10 min, respectivamente), e

lavadas em grande quantidade de água. Em seguida, estas sementes, além das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Carioca, foram tratadas com álcool absoluto por 30 seg e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (30%), por três minutos, e lavadas com água destilada esterilizada.

Posteriormente, as sementes de feijão (30,0 g), *M. flocculosa* (5,0 g) e *L. leucocephala* (10,0 g) foram imersas em 200, 100 e 100 mL de água destilada esterilizada, respectivamente, e mantidas 24 h no escuro a 30°C, sob leve agitação (80 rpm). Parte dessas misturas de água e exsudatos foi utilizada na avaliação da expressão dos genes *nod* das estirpes de rizóbio e parte foi utilizada nos estudos de estabelecimento da nodulação do feijoeiro.

### Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium* na presença de exsudatos de sementes de feijoeiro, *M. flocculosa* e *L. leucocephala*

A capacidade indutora dos genes da nodulação de *Rhizobium* foi avaliada pela atividade da enzima β-glucuronidase, cuja síntese é codificada pelo gene *gusA*, utilizando, como substrato, *p*-nitrofenil-β-D-glucuronídeo, na concentração de 1.000 µg mL<sup>-1</sup> (Jefferson, 1987).

Inicialmente, o plasmídeo pGUS32 (van Rhijn et al., 1993), no qual o gene *gusA* encontra-se sob o controle do promotor dos genes *nodABC*, foi introduzido, por conjugação, nas estirpes de *R. tropici* (CIAT 899 e F 98.5), *R. etli* (CFN 42) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (CNPAF 512). As estirpes CIAT 899, CFN 42 e CNPAF 512 que continham a fusão *nodA::gusA* foram gentilmente cedidas por C. de O. Cunha ("Catholic University of Leuven" - Bélgica). Tais estirpes foram crescidas por dois dias em "meio mínimo" (YM- Vincent, 1970-modificado pela substituição do extrato de levedura por 1 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), a 30°C.

Nas análises da expressão dos genes da nodulação, foram adicionados 20 µL das culturas de bactéria e utilizadas concentrações variadas (0, 20, 40, 60, 80 e 90%) de exsudatos de sementes, padronizando-se o volume final com solução nutritiva isenta de nitrogênio (Norris & T'Mannetje, 1964, modificada), segundo Mercante (1997).

Após os períodos de 24 e 48 h, as reações foram realizadas pela adição de 100 µL do "tampão GUS" (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,1% Triton 100, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1% SDS (sódio dodecil sulfato), pH 7,0) para 100 µL das culturas induzidas, sob temperatura de 37°C. Após um período de uma hora de reação, essa foi paralisada pela adição de 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Parte dos exsudatos foi esterilizada por filtração, em filtros milipore (Millex, Milipore S.A.) esterilizados, com diâmetro dos poros de 0,22 µm, e parte foi analisada sem esterilização (exsudato bruto). As absorvâncias foram medidas a 405 e 595 nm e as unidades calculadas conforme Miller (1972).

### **Estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes**

O efeito da adição de exsudatos de sementes de *M. flocculosa* e *L. leucocephala* no estabelecimento da nodulação do feijoeiro foi avaliado em dois experimentos, sob condições controladas de casa de vegetação ("Experimento A") e câmara de crescimento ("Experimento B") - 12 h de luz dia<sup>-1</sup>, a 25°C. Em ambos os experimentos, as estirpes de *R. tropici* (CIAT 899 e F 98.5), *R. etli* (CFN 42) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (CNPAF 512) foram inoculadas no feijoeiro, que também foi suprido com exsudatos de sementes de *M. flocculosa* ou *L. leucocephala*. No "Experimento B", avaliou-se, ainda, o efeito da adição de N-mineral no estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença/ausência dos exsudatos de sementes de *M. flocculosa*. Em ambos os experimentos, foram incluídos tratamentos sem inoculação e sem suprimento de exsudatos de sementes. No "Experimento A", avaliaram-se as plantas crescidas em condições axênicas (vasos de "Leonard", com areia e vermiculita - 2:1, v:v) e, no "Experimento B", as plantas foram crescidas em recipientes (500 mL) com Podzólico Vermelho-Amarelo (PVA) - série "Itaguaí".

### **Condições de crescimento das plantas e inoculação das sementes**

No cultivo do feijoeiro em vasos de "Leonard" (quatro sementes por unidade), foram adicionados 2 mL das culturas de rizóbio (10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>). Aos tratamentos foram adicionados exsudatos de sementes de *M. flocculosa* ou *L. leucocephala* (0,5 mL, por semente de feijão). No "Experimento B", a adubação nitrogenada foi efetuada a cada dois dias, utilizando a dose de 4 mg N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, por planta, totalizando 28 mg planta<sup>-1</sup> de N (17 dias após a emergência - DAE).

Em ambos os experimentos, as plantas foram supridas com solução nutritiva sem nitrogênio (Norris & T'Mannetje, 1964, modificada), conforme descrito em Mercante (1997). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições.

## **RESULTADOS**

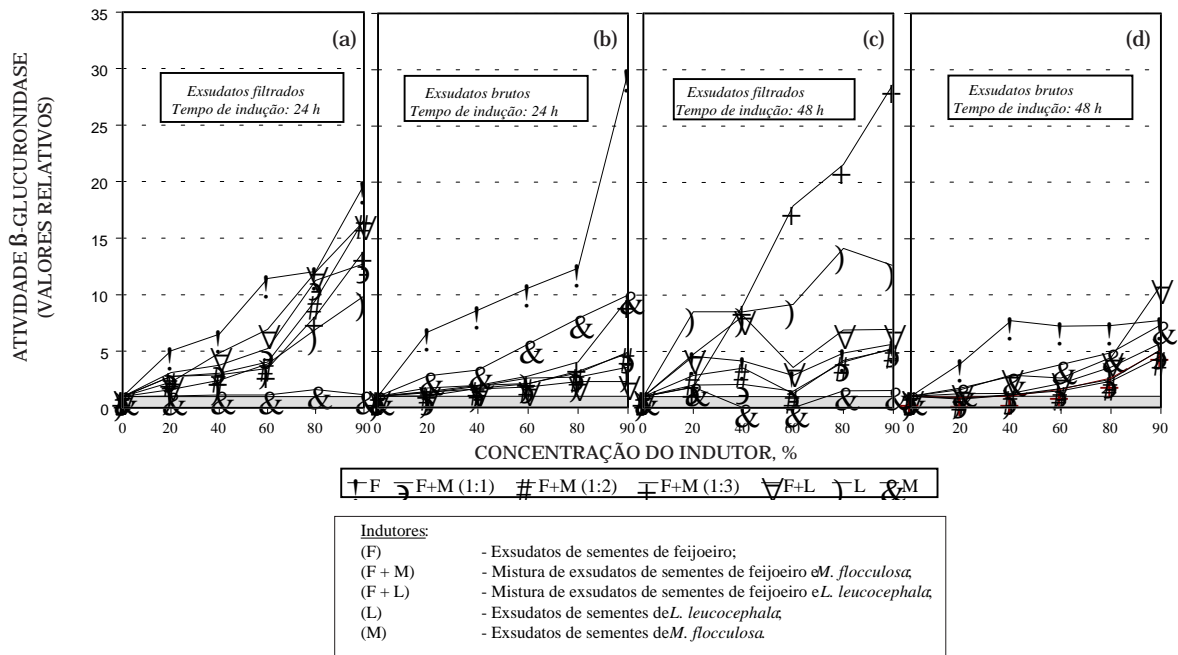
### **Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium* na presença de exsudatos de sementes de *P. vulgaris*, *M. flocculosa* e *L. leucocephala***

Observaram-se os valores mais elevados da atividade da enzima β-glucuronidase nas estirpes CIAT 899 (pGUS 32) e CFN 42 (pGUS 32), entre as quatro testadas, quando os exsudatos, tanto de sementes de feijoeiro quanto das duas leguminosas arbóreas, foram utilizados como indutores dos genes *nod*.

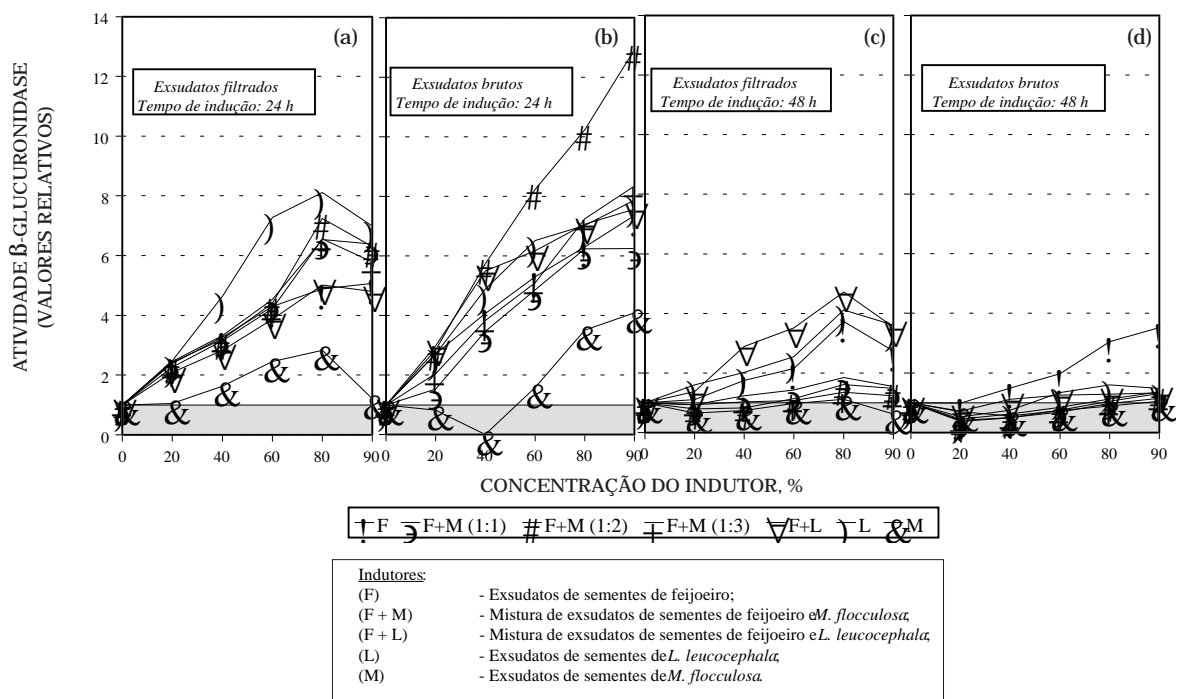
A utilização dos exsudatos filtrados como indutores do gene *nodA* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) proporcionou, com 24 h de indução, valores mais elevados na atividade da enzima β-glucuronidase, quando se usou 90% da concentração dos indutores (Figura 1a). Uma exceção, entretanto, foi observada com os exsudatos de sementes de *M. flocculosa*, que não demonstraram nenhuma atividade indutora, independentemente da concentração utilizada. Com os demais exsudatos, a expressão dos genes *nod* observada esteve entre 10 e 20 vezes maiores do que o controle sem indutor (Figura 1a). Avaliando as induções no período de 48 h com os exsudatos de sementes filtrados (Figura 1c), verificou-se que as maiores atividades da enzima β-glucuronidase foram obtidas com a mistura de exsudatos de sementes de feijão e *M. flocculosa* (1:3), atingindo valores, aproximadamente, 30 vezes superiores ao do controle sem indutor ou ao do tratamento em que foram usados apenas exsudatos de sementes de *M. flocculosa*, que também não demonstrou nenhuma atividade indutora dos genes *nod*. O efeito da mistura dos exsudatos foi vinte vezes superior, em comparação ao uso apenas de exsudatos de sementes de feijão como indutor. Analisando os exsudatos de sementes que não foram filtrados, foram encontrados, com 24 h de indução, os maiores valores da atividade indutora para os exsudatos de feijão que não foram combinados com exsudatos de sementes de outras espécies, principalmente na concentração de 90% de indutor (Figura 1b). Entretanto, com 48 h de indução, não se verificaram diferenças evidentes entre os diferentes compostos exsudados (combinados ou não), utilizados como indutores, atingindo valores de cinco a dez vezes maiores do que o do tratamento sem indutor, na concentração de 90 % de indutor (Figura 1d).

A expressão do gene *nodA* da estirpe F 98.5 (pGUS 32), na presença dos exsudatos de sementes das espécies leguminosas utilizadas, apresentou uma variação na atividade indutora, conforme a concentração de exsudatos utilizados como indutores e o tipo de composto liberado pelas sementes das diferentes espécies (Figura 2). Após 24 h de indução, os valores mais elevados da atividade da enzima β-glucuronidase foram observados com a mistura de exsudatos brutos de feijoeiro e *M. flocculosa*. Esse aumento sinérgico na atividade indutora dos genes *nod* foi observado, principalmente, na concentração de indutor de 90% (Figura 2b). De maneira geral, a atividade indutora dos genes *nod* decresceu após o período de 48 h de indução (Figuras 2c e 4d).

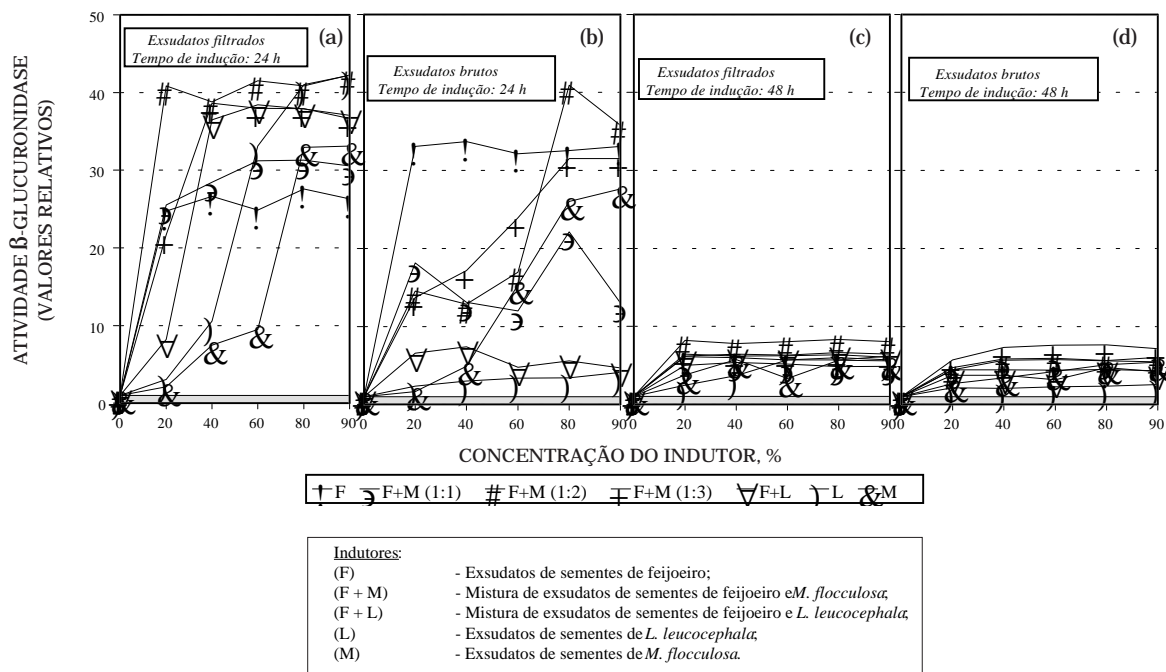
Quando se utilizaram exsudatos liberados pelas sementes das leguminosas como indutores dos genes *nodA* da estirpe CFN 42 (pGUS 32), observou-se uma expressão bastante elevada da capacidade indutora, principalmente após o período de 24 h de indução (Figuras 3a e 3b). Na avaliação realizada neste período com os exsudatos filtrados, verificou-se um aumento sinérgico na atividade indutora dos



**Figura 1.** Atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes filtrados (a, c) e brutos (b, d), em dois tempos de indução distintos (24 e 48 h). Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.



**Figura 2.** Atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe F 98.5 (pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes filtrados (a, c) e brutos (b, d), em dois tempos de indução distintos (24 e 48 h). Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.



**Figura 3.** Atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CFN (pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes filtrados (a, c) e brutos (b, d), em dois tempos de indução distintos (24 e 48 h). Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.

genes *nod*, quando utilizada a mistura de exsudatos de sementes de *P. vulgaris* e *M. flocculosa* (Figura 3a). Tal efeito foi verificado mesmo nas concentrações mais baixas de indutores, alcançando valores, aproximadamente, quarenta vezes superiores ao do tratamento controle (sem indutor) e quinze vezes ao do tratamento sem os exsudatos de *M. flocculosa* presentes (Figura 3a). Após 48 h de indução, não foram detectadas diferenças expressivas na atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase entre os tratamentos (Figuras 3c e 3d).

A atividade de indução dos genes da nodulação da estirpe CNPAF 512 (pGUS 32), na presença de exsudatos de sementes das espécies leguminosas, foi mais acentuada quando se utilizaram exsudatos filtrados (Figuras 4a e 4c). Após os períodos de 24 e 48 h de indução, os exsudatos filtrados promoveram aumentos na atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, mesmo nas concentrações mais baixas de indutores (Figuras 4a e 4c). Por outro lado, os exsudatos brutos promoveram baixa atividade indutora dos genes da nodulação após 24 h de indução (Figura 4b) e nenhuma atividade após 48 h de indução (Figura 4d).

#### Estabelecimento da nodulação do feijoeiro em condições axênicas (Experimento A)

A adição de exsudatos de sementes, tanto de *M. flocculosa* quanto de *L. leucocephala*, no plantio do

feijoeiro proporcionou aumento significativo na sua nodulação, quando a estirpe CFN 42 foi inoculada (Figura 5a). Nesse caso, verificou-se aumento na nodulação de, aproximadamente, 46 e 40%, respectivamente, em relação ao tratamento com *P. vulgaris* não suprido com exsudatos adicionais.

#### Estabelecimento da nodulação do feijoeiro em vasos com solo PVA, suprido ou não com N-mineral (Experimento B)

Com a inoculação da estirpe CIAT 899, a adição de exsudato de semente de *M. flocculosa* neutralizou o efeito inibitório do N mineral na produção de nódulos do feijoeiro (Figura 5b), efeito este não observado com a inoculação das demais estirpes de rizóbio.

## DISCUSSÃO

A avaliação da expressão dos genes *nod*, por meio da fusão *gusA::nodABC*, determinada na presença de exsudatos de sementes, demonstrou aumento sinérgico significativo na capacidade indutora dos genes *nod* das estirpes de *R. tropici* (CIAT 899 e F 98.5) e *R. etli* (CFN 42), pela mistura de exsudatos de feijoeiro e *M. flocculosa*. Essas interações sinérgicas podem ocorrer, uma vez que a proteína

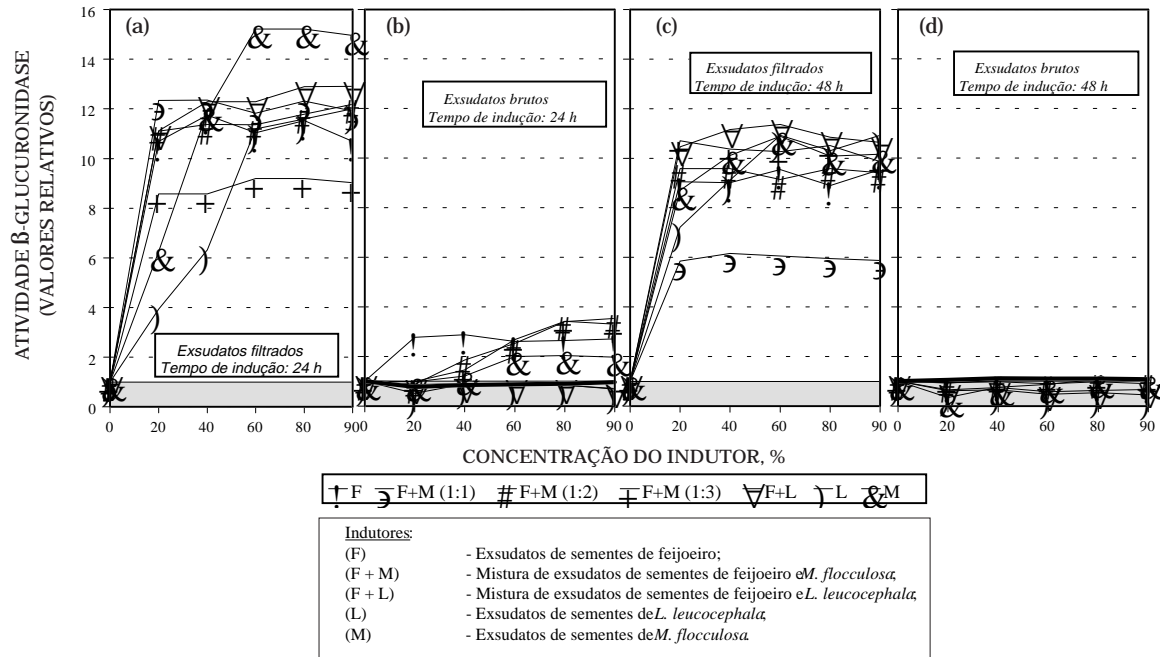


Figura 4. Atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CNPAF 512 (pGUS 32) pela presença de exsudatos de sementes filtrados (a, c) e brutos (b, d), em dois tempos de indução distintos (24 e 48 h). Valores relativos aos controles (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0.

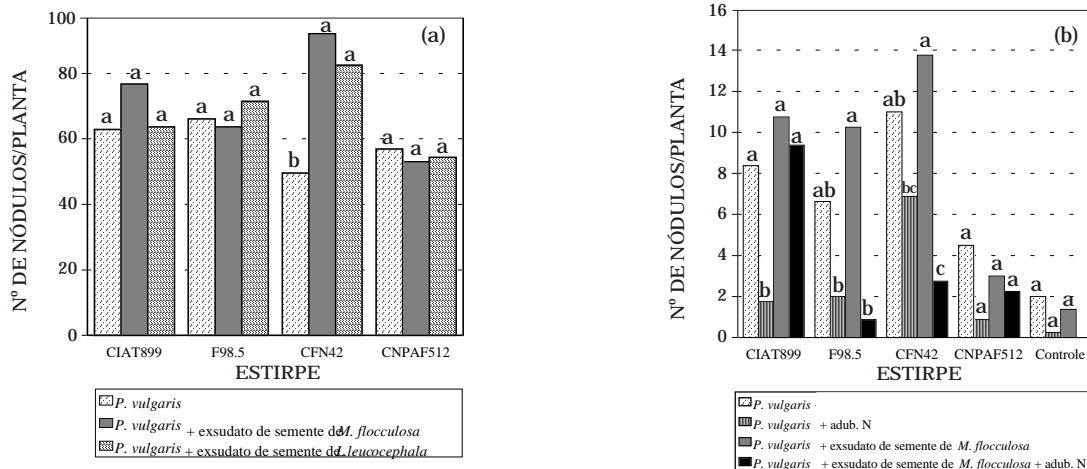


Figura 5. Número de nódulos de feijoeiro, cv. Carioca, crescido em condições axênicas (a) e solo (b), com diferentes estirpes de *Rhizobium* inoculadas, suprido ou não com exsudatos de sementes de *M. flocculosa* ou *L. leucocephala* e, ou, N-mineral. Valores médios de quatro repetições. Letras diferentes dentro dos tratamentos de cada estirpe de rizóbio diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

NodD pode atuar como um complexo multimérico, interagindo com diferentes flavonóides indutores (Dénarié et al., 1992). Neste caso, a proteína NodD apresentaria vários sítios de ligação com indutores, ocasionando uma atividade mais elevada. Outra possível explicação estaria relacionada com o efeito

aditivo dos compostos indutores liberados pelas sementes das leguminosas, que estimulariam maior expressão dos genes da nodulação. Esta segunda hipótese, entretanto, parece menos provável, uma vez que o efeito observado foi independente da proporção entre os exsudatos de feijoeiro e

*M. flocculosa* e da concentração desses indutores, na maioria das estirpes (Figura 1).

O efeito sinérgico na capacidade indutora dos genes *nod* entre os compostos fenólicos exsudados já foi observado em diversas espécies leguminosas, inclusive com o feijoeiro. Com alfafa, observou-se um efeito sinérgico produzido por uma chalcona e uma flavona, em *R. meliloti* (Hartwig et al., 1989). No caso do feijoeiro, Bolaños-Vásquez & Werner (1997) identificaram dois flavonóides (liquiritigenina e isoliquiritigenina) presentes nos exsudatos radiculares de feijoeiro e observaram um aumento significativo e sinérgico na expressão dos genes *nod*, quando daidzeína (na concentração de 3 µM) foi adicionada a estes flavonóides. Efeitos similares na indução dos genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* foram previamente descritos para eriodictiol e naringenina em combinação com genisteína (Hungria et al., 1992).

Os resultados apresentados neste trabalho revelam que a adição de exsudatos de sementes de *M. flocculosa* no plantio do feijoeiro pode trazer benefícios, como o aumento na nodulação inicial do feijoeiro. Essa nodulação mais precoce e abundante pode contribuir significativamente para o aumento do potencial simbiótico do feijoeiro (Barradas & Hungria, 1989). Esse aumento da nodulação, provavelmente, estaria relacionado com a interação dos compostos indutores presentes nos exsudatos das sementes de ambas as espécies leguminosas, tornando os indutores dos genes *nod* do rizóbio mais potentes.

Outra possível especulação em relação ao aumento na nodulação do feijoeiro poderia estar relacionada com uma conseqüente mudança no balanço fitormonal na sua rizosfera, ocasionada pela interação dos flavonóides presentes nos exsudatos de sementes de *M. flocculosa* e os compostos liberados pelo feijoeiro. Tem sido demonstrado que as taxas de hormônios nas plantas podem ser alteradas pelos flavonóides liberados, ocasionando um desbalanço hormonal endógeno na raiz (Hirsch, 1992). Essas alterações levariam a divisões celulares na raiz, produzindo sítios de infecção adicionais para o rizóbio e, conseqüentemente, aumento na nodulação (Srinivasan et al., 1996, 1997). A organogênese do nódulo claramente envolve os fitormônios (Hirsch & Fang, 1994), mas ainda não está claro se os níveis de fitormônios elevados nos nódulos são resultado da resposta da planta à infecção da bactéria ou de uma função direta da atividade da bactéria.

Resultados recentes apresentados por Srinivasan et al. (1996, 1997) demonstraram aumento na nodulação do feijoeiro, quando uma estirpe de *R. etli* (TAL 182) e isolados de *Bacillus* spp. foram inoculados concomitantemente. Os isolados de *Bacillus*, que aumentaram a nodulação do feijoeiro, também produziram quantidades significativamente mais elevadas de ácido indolacético (AIA). Além do aumento na nodulação do feijoeiro, tal coinoculação também aumentou a atividade da nitrogenase dos nódulos e

o conteúdo de proteína solúvel total dos nódulos. Essa maior atividade da nitrogenase foi atribuída ao aumento no conteúdo de leghemoglobina nos nódulos radiculares. Srinivasan et al. (1997) demonstraram, ainda, que *Bacillus* spp. influenciou a auto-regulação mediada pelo hospedeiro, provocando a nodulação heteróloga de *Phaseolus acutifolius* por *R. etli*.

No presente estudo, avaliou-se também o efeito da adição de nitrogênio mineral sobre a nodulação do feijoeiro, na presença/ausência de exsudatos de sementes de *M. flocculosa*. A adição de nitrogênio mineral (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) no plantio do feijoeiro ocasionou efeitos variados na nodulação inicial, dependendo da estirpe de rizóbio inoculada e do suprimento adicional de exsudatos de sementes de *M. flocculosa*. De maneira geral, houve uma tendência de inibição da nodulação pelo suprimento de N mineral. Embora a inibição da nodulação por N combinado seja conhecida há bastante tempo, os mecanismos pelos quais ela ocorre ainda são muito pouco conhecidos (Streeter, 1988; Heidstra et al., 1997).

De maneira geral, o efeito inibitório do nitrogênio combinado na formação dos nódulos e na fixação de N<sub>2</sub> pode ser exercido em vários estádios (Streeter, 1988): controlar a produção de flavonóides pela planta, influenciar a adesão da bactéria à parede celular da raiz e alterar a taxa de infecção pelo rizóbio, a atividade da nitrogenase e a massa de nódulos por planta. De acordo com Schultze et al. (1994), o primeiro efeito do N mineral no estabelecimento da simbiose pode ocorrer já no reconhecimento entre a planta hospedeira e o *Rhizobium*, atuando em diferentes etapas do processo de infecção: (1) ausência de indução do gene *nod* do rizóbio pela perda de flavonóides indutores e, ou, repressão da expressão do gene *nod*; (2) incapacidade da bactéria em ligar-se aos pêlos radiculares para iniciar a deformação do pêlo radicular e formação do cordão de infecção; (3) perda da percepção dos sinais Nod (fatores Nod), em virtude da ausência de um receptor ou via de transdução do sinal funcional. Essa terceira possibilidade, entretanto, parece menos provável, pois resultados recentes apresentados por Heidstra et al. (1997) demonstraram que a percepção e transdução do fator Nod não são afetadas por NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Embora a fixação simbiótica de N<sub>2</sub> tenha sido relacionada como uma via facultativa, que, provavelmente, pelo seu alto custo energético, não é a via preferida de assimilação de nitrogênio (Schultze et al., 1994), observou-se que a nodulação inicial do feijoeiro não foi afetada pela adição de nitrogênio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), quando se inoculou a estirpe CIAT899 (*R. tropici* IIB) e os exsudatos de sementes de *M. flocculosa* foram fornecidos, simultaneamente. Pode-se especular que tal observação poderia envolver a produção de compostos fenólicos produzidos por ambas as espécies, e, neste caso, pela ação sinérgica entre os compostos, o N mineral adicionado não afetaria a concentração dos compostos indutores e, conseqüentemente, a indução do gene *nod* do rizóbio.



Como tem sido observado, o suprimento de flavonóides indutores do gene *nod* do rizóbio pode ser limitante ao estabelecimento da simbiose. Kapulnik et al. (1987) observaram que os níveis normais de indutores (flavona) na rizosfera de alfafa estavam limitando a nodulação, fixação de N<sub>2</sub> e crescimento das plântulas. Essa limitação foi superada após a aplicação de apenas 10 µM de luteolina. Do mesmo modo, a adição de exsudatos de sementes de *M. flocculosa* pode ter provocado uma resposta mais potente dos sinais da bactéria (fatores Nod), de forma que a planta respondesse com a produção de novos compostos fenólicos que aumentasse a expressão dos genes *nod* do rizóbio, mesmo na presença de N mineral no meio.

Existem, ainda, evidências de que determinados hormônios da planta podem estar envolvidos no controle da nodulação pelo nitrogênio, como o ácido indolacético (AIA) que é necessário para o processo de infecção, o qual pode ser destruído pelo nítrito formado pela adição de nitrato (Dixon, 1969, citado por Streeter, 1988). Contudo, o AIA ligado ao nitrato, pelo menos parcialmente, compensaria o efeito negativo do nitrato na infecção. Assim, no presente estudo, o efeito não-inibitório do N adicionado na nodulação do feijoeiro, ocasionado pela inoculação de *R. tropici* (CIAT899) e fornecimento de exsudatos de sementes de *M. flocculosa*, pode ser atribuído ao estímulo na raiz (causado por um desbalanço hormonal), levando a uma produção mais elevada de AIA, o que possibilitou a infecção da bactéria e formação de nódulos, mesmo na presença do N mineral adicionado. A nodulação e a fixação do N<sub>2</sub> no feijoeiro na presença de N-mineral representam grande importância no manejo da cultura, considerando que essa poderia beneficiar-se das duas fontes de N e, conseqüentemente, alcançar níveis mais elevados de produtividade.

Outros estudos, porém, são necessários para entender a complexa interação dos sinais produzidos pelo macro e microssimbionte, especialmente quanto à avaliação dos fatores da nodulação do rizóbio (fatores Nod), na presença de compostos exsudados. As evidências experimentais observadas possibilitam obter incrementos na nodulação do feijoeiro pelos sinais moleculares presentes nos exsudatos de sementes de outra espécie leguminosa (*M. flocculosa*).

## CONCLUSÕES

1. A utilização de exsudatos de sementes de feijoeiro, *M. flocculosa* e *L. leucocephala* como indutores dos genes *nod* promoveu os valores mais elevados na expressão da atividade da enzima β-glucuronidase nas estirpes CIAT 899 (pGUS 32) e CFN 42 (pGUS 32). A mistura de exsudatos de sementes de feijoeiro e *M. flocculosa* foi capaz de promover aumentos sinérgicos significativos na

expressão dos genes *nod* dessas duas estirpes, além da estirpe F 98.5/pGUS 32 (*R. tropici*).

2. O suprimento de exsudatos de sementes, tanto de *M. flocculosa* quanto de *L. leucocephala*, proporcionou significativo aumento na nodulação do feijoeiro com a inoculação da estirpe CFN 42 (*R. etli*).

3. A adição parcelada de N-mineral não influenciou a nodulação do feijoeiro em solo, quando foi inoculada a estirpe CIAT899 (*R. tropici*) e fornecidos os exsudatos de sementes de *M. flocculosa*.

## LITERATURA CITADA

- BARRADAS, C.A.A. & HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I - Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. Turrialba, 39:236-242, 1989.
- BOLAÑOS-VÁSQUEZ, M.C. & WERNER, D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod* gene-inducing flavonoids in root exsudates of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant-Microbe Interact., 10:339-346, 1997.
- DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F. & ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. Ann. Rev. Microbiol., 46:497-531, 1992.
- DJORDJEVIC, M.A.; REDMOND, J.W.; BATLEY, M. & ROLFE, B.G. Clover secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii*. EMBO J., 6:1173-1179, 1987.
- DUSHA, I.; BAKOS, A.; KONDOROSI, A.; DE BRUIJN, F.J. & SCHELL, J. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. Mol. Gen. Genet., 219:89-96, 1989.
- FIRMIN, J.L.; WILSON, K.E.; ROSSEN, L. & JOHNSTON, A.W.B. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. Nature, 324:90-92, 1986.
- HARTWIG, U.A.; MAXWELL, C.A.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. Interactions among flavonoid *nod* gene inducers released from alfalfa seeds and roots. Plant Physiol., 91:1138-1142, 1989.
- HEIDSTRA, R.; NILSEN, G.; MARTINEZ-ABARCA, F.; van KAMMEN, A. & BISSELING, T. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> inhibition on root hair deformation. Mol. Plant-Microbe Interact., 10:215-220, 1997.
- HIRSCH, A.M. Developmental biology of legume nodulation. New Phytol., 122:211-237, 1992.
- HIRSCH, A.M. & FANG, Y. Plant hormones and nodulation: what is the connection? Plant Mol. Biol., 26:5-9, 1994.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. R. Bras. Ci. Solo, 18:339-364, 1994.
- HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B. & PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Mol. Plant-Microbe Interact., 5:199-203, 1992.

- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5:387-405, 1987.
- KAPULNIK, Y.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiol.*, 84:1193-1196, 1987.
- KONDOROSI, E. Regulation of nodulation genes in rhizobia. In: VERMA, D.P.S., ed. *Molecular signals in plant-microbe communication*. Boca Raton, CRC, 1992.
- KRISHNAN, H.B.; KUO, C.L. & PUEPPKE, S.G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both *nodD1* and *nodD2*, and is dependent on the cultivar-specificity locus, *noIXWBTUV*. *Microbiol.*, 141:2245-2251, 1995.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C. & DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344:781-784, 1990.
- LONG, S.R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56:203-214, 1989.
- LÓPEZ-LARA, I.M.; van DER DRIFT, K.M.G.M.; van BRUSSEL, A.A.N.; HAVERKAMP, J.; LUGTENBERG, B.J.J.; THOMAS-OATES, J.E. & SPAINK, H.P. Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Mol. Biol.*, 29:465-477, 1995.
- MERCANTE, F.M. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e troca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeiras. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 199p. (Tese de Doutorado)
- MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; MARTINS, L.M.V.; FRANCO, A.A. & RUMJANEK, N.G. Efeito do nitrogênio mineral na troca de sinais moleculares durante o processo de infecção das raízes do feijoeiro por *Rhizobium*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, 1995. Resumos... Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. 1:495-497.
- MILLER, J.H. *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- NORRIS, D.O. & TMANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. *East Afr. Agric. For. J.*, 29:214-35, 1964.
- PETERS, N.K.; FROST, J.W. & LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233:977-980, 1986.
- REDMOND, J.W.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M.A.; INNES, R.W.; KUEMPEL, P.L. & ROLFE, B.G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*, 323:632-635, 1986.
- SCHULTZE, M.; KONDOROSI, E.; RATET, P.; BUIRÉ, M. & KONDOROSI, A. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 156:1-75, 1994.
- SCHULTZE, M.; QUICLET-SIRE, B.; KONDOROSI, E.; VIRELIZIER, H.; GLUSHKA, J.N.; ENTRE, G.; GÉRO, S.D. & KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:192-196, 1992.
- SPAINK, H.P.; SHEELEY, D.M.; van BRUSSEL, A.A.N.; GLUSHKA, J.; YORK, W.S.; TAK, T.; GEIGER, O.; KENNEDY, E.P.; REINHOLD, V.N. & LUGTENBERG, B.J.J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 354:125-130, 1991.
- SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D.J. & HOLL, F.B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Can. J. Microbiol.*, 42:1006-1014, 1996.
- SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D.J. & HOLL, F.B. Nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* is enhanced by the presence of *Bacillus*. *Can. J. Microbiol.*, 43:1-8, 1997.
- STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *CR Out. Rev. Plant Sci.*, 7:1-23, 1988.
- TRUCHET, G.; ROCHE, P.; LEROUGE, P.; VASSE, J.; CAMUT, S.; DE BILLY, F.; PROMÉ, J.C. & DÉNARIÉ, J. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, 351:670-673, 1991.
- van RHIJN, P. & VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.*, 59:124-142, 1995.
- van RHIJN, P.J.S.; FEYS, B.; VERRETH, C. & VANDERLEYDEN, J. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.*, 175:438-447, 1993.
- VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. London, International Biological Programme, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15)
- WANG, S.P. & STACEY, G. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.*, 223:329-331, 1990.
- ZAAT, S.A.J.; van BRUSSEL, A.A.N.; TAK, T.; PEES, E. & LUGTENBERG, B.J.J. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *J. Bacteriol.*, 169:3388-3391, 1987.