



# FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola  
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

## Indução dos Genes da Nodulação de *Rhizobium tropici* pela Presença de Exsudatos de Sementes de Leguminosas

Mayara Barbosa Silva<sup>(1)</sup>; Ricardo Augusto Dante<sup>(2)</sup>; Fábio Martins Mercante<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados; Rodovia Dourados/Itahum BR- Dourados-MS; [mayarabarbosa-1@hotmail.com](mailto:mayarabarbosa-1@hotmail.com); <sup>(2)</sup> Pesquisador, Embrapa Agropecuária Oeste, Caixa Postal 449, 79804-970, Dourados, MS; [radante@cpao.embrapa.br](mailto:radante@cpao.embrapa.br); [mercante@cpao.embrapa.br](mailto:mercante@cpao.embrapa.br).

**RESUMO** – Sementes de leguminosas secretam substâncias (exsudatos) que atuam como quimioatraentes e como indutores dos genes da nodulação de rizóbios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes da nodulação da estirpe CIAT 899/pGUS32 de *R. tropici*, na presença de exsudatos de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), leucena (*Leucaena leucocephala*), bracatinga-do-campo-mourão (*Mimosa flocculosa*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Tais exsudatos foram testados individualmente e em combinações de diferentes espécies. A capacidade indutora dos genes da nodulação de *R. tropici* (CIAT 899) foi avaliada pela atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, cuja síntese é codificada pelo gene *gusA*, utilizando, como substrato, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronídeo (PNPG), na concentração de 1.000 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Os valores obtidos na absorvância e convertidos em Unidades Miller mostraram que exsudatos de todas as sementes testadas promoveram aumento da atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, ou seja, atuaram como indutores dos genes da nodulação dos rizóbios. A combinação de exsudatos de leucena e soja, nas proporções de 1:1 e 1:2 (v:v), mostrou-se a mais eficiente como indutora dos genes *nod*, sendo superiores ( $p < 0,05$ ) aos demais aditivos avaliados. De modo geral, os resultados revelaram o potencial do uso de exsudatos como aditivo aos inoculantes microbianos para aumento da nodulação do feijoeiro e, conseqüentemente, dos patamares de fixação biológica de nitrogênio na cultura.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glucuronidase, genes *nod*, *Phaseolus vulgaris*

**INTRODUÇÃO** – A cultura do feijoeiro está vinculada principalmente ao contingente de pequenos produtores, que praticam agricultura familiar, e seu consumo representa a maior fonte proteica das populações de baixa renda nos países da América Latina e África (Pinto et al., 2007). Neste contexto, as baixas produtividades verificadas na cultura do feijoeiro no Brasil têm sido relacionadas ao baixo nível tecnológico empregado pelos produtores e ao cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N (Mercante et al., 1999). Considerando a baixa eficiência de uso do fertilizante

nitrogenado (cerca de 50%), exigindo aplicações cada vez mais frequentes e, conseqüentemente, elevando os custos de produção, aliada ao custo ecológico adicional, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) assume uma importância ainda mais evidente, representando a alternativa mais viável para o fornecimento de nitrogênio à cultura. Entretanto, em muitos casos, tem-se observado baixa frequência de resposta à inoculação do feijoeiro em condições de campo, que tem sido atribuída a diferentes fatores, incluindo a baixa nodulação das plantas.

Assim, a busca por aumento na produtividade de grãos de feijoeiro, a baixo custo econômico e que seja capaz de manter a sustentabilidade, conta com a prospecção de recursos biotecnológicos, capazes de promover aumento da nodulação e potencializar a FBN nesta cultura.

A formação de nódulos radiculares fixadores de nitrogênio se inicia com a comunicação entre macro e microssimbionte e a expressão de genes responsáveis pela infecção. Nesta comunicação, trocas de sinais envolvem a ativação da expressão dos genes da nodulação (*nod*) do rizóbio por diferentes compostos, como flavonoides, produzidos pelas plantas (Peters e Long, 1986; Rossen et al., 1987; Zaat et al., 1989). Os flavonoides e outras substâncias estão presentes em exsudatos de sementes e raízes, atuando não apenas como quimioatraentes para as bactérias, mas também como indutores dos genes *nod* de rizóbios (Mercante e Franco, 2000; Mercante et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos genes da nodulação da estirpe CIAT 899/pGUS32 de *R. tropici*, na presença de exsudatos de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), leucena (*Leucaena leucocephala*), bracatinga-do-campo-mourão (*Mimosa flocculosa*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*).

### MATERIAL E MÉTODOS

#### – Obtenção dos exsudatos das sementes

Inicialmente, as sementes de leucena (*Leucaena leucocephala*), bracatinga-do-campo-mourão (*Mimosa flocculosa*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) foram escarificadas, utilizando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, por 5 minutos, e lavadas em grande quantidade de água. Em seguida, as sementes destas espécies, além das sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e feijoeiro comum

(*Phaseolus vulgaris* L.), foram tratadas com álcool absoluto, por 30 segundos, imersas em hipoclorito de sódio (2,5%), por três minutos, e lavadas, por sete vezes, em água destilada esterilizada, concluindo o processo de esterilização superficial das mesmas.

Para obtenção dos exsudatos, todas as sementes (10g de cada espécie), foram imersas em 90mL de água destilada esterilizada e mantidas, por cerca de 12 h, no escuro, sob agitação (80 rpm), à 28°C. A mistura obtida de água e exsudatos foi utilizada para a avaliação da expressão dos genes *nod* de rizóbio.

### Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium* na presença de exsudatos de sementes de soja, feijoeiro, leucena, bracatinga-do-campo-mourão e feijão-de-porco

A capacidade indutora dos genes da nodulação de *R. tropici* (CIAT 899) foi avaliada pela atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, cuja síntese é codificada pelo gene *gusA*, utilizando, como substrato, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronídeo (PNPG), na concentração de 1.000 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. (Jefferson, 1987).

Culturas com a estirpe CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, marcada com plasmídeo pGUS32, foram crescidas em meio YMA com espectinomicina (Sp<sup>100</sup>), sendo transferida para tubos de ensaio com 5mL de "meio mínimo- YM" (Vincent, 1970) e mantidas, por cerca de 12 h, à 28°C.

Utilizaram-se como indutores dos genes da nodulação exsudatos de apenas uma espécie individualmente e combinações de espécies diferentes, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Soluções de água contendo exsudatos de sementes de leguminosas combinadas em proporções diferentes.

Combinações de Exsudatos de Leguminosas (v:v)			
*FP + FC	FC + M 1:1	M + L 1:1	L + S 1:1
FP + FC 1:2	FC + M 1:2	M + L 1:2	L + S 1:2
FP + FC 2:1	FC + M 2:1	M + L 2:1	L + S 2:1
FP + M 1:1	FC + L 1:1	M + S 1:1	
FP + M 1:2	FC + L 1:2	M + S 1:2	
FP + M 2:1	FC + L 2:1	M + S 2:1	
FP + L 1:1	FC + S 1:1		
FP + L 1:2	FC + S 1:2		
FP + L 2:1	FC + S 2:1		
FP + S 1:1			
FP + S 1:2			
FP + S 2:1			

\*FP = Feijão-de-porco; FC = Feijão comum; M = *Mimosa flocculosa*; S = Soja; L = Leucena.

Nas análises da expressão dos genes da nodulação, foram adicionados 20 $\mu$ L da cultura de *R. tropici* (CIAT 899/pGUS32) e 180 $\mu$ L dos exsudatos de sementes puros e combinados, filtrados a 0,22  $\mu$ m, sendo incubada por 18 horas, à 28° C. Em seguida, as reações foram realizadas pela adição de 100  $\mu$ l da solução GUS-BUFFER + PNPG. Após o período de incubação (duas horas), à 37°C, a reação foi paralisada pela adição de 100 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

As absorbâncias foram medidas em 405 e 595nm e as unidades calculadas conforme Miller (1972).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – Os valores obtidos na absorbância e convertidos em Unidades Miller mostraram que exsudatos de todas as sementes testados promoveram aumento da atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase, ou seja, atuaram como indutores dos genes da nodulação dos rizóbios. A combinação de exsudatos de leucena e soja, nas proporções de 1:1 e 1:2 (v:v) mostrou-se a mais eficiente como indutora dos genes *nod*, sendo superior ( $p < 0,05$ ) aos demais aditivos avaliados (Figura 1). Outros dois indutores (soja e a combinação de exsudatos de leucena e soja, 2:1) também demonstraram elevada capacidade indutora, embora inferior às combinações/proporções acima mencionada. Os exsudatos obtidos de feijão-de-porco, quando utilizados isoladamente ou combinados com outras espécies, proporcionaram as menores taxas de indução dos genes da nodulação da estirpe CIAT 899/pGUS 32 (Figura 1). Estudos realizados por Mercante e Franco (2000), utilizando exsudatos de sementes de feijoeiro, *M. flocculosa* e *L. leucocephala*, demonstraram que a mistura de exsudatos de sementes de feijoeiro e *M. flocculosa* foi capaz de promover aumentos sinérgicos significativos na expressão dos genes *nod* da estirpe CIAT 899/pGUS32.

De modo geral, os resultados revelaram o potencial do uso de exsudatos como aditivo aos inoculantes microbianos para aumento da nodulação do feijoeiro e, conseqüentemente, dos patamares de fixação biológica de nitrogênio na cultura.

**CONCLUSÃO** – O uso de exsudatos de sementes de leguminosas promove aumentos sinérgicos na expressão dos genes *nod* da estirpe CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), podendo resultar em incrementos da nodulação do feijoeiro.

### REFERÊNCIAS

- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system. **Plant Mol. Biol.** 5: 387-405, 1987.
- MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A. 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*. **R. Bras. Ci. Solo**, 24:301-310, 2000.
- MERCANTE, F.M.; GOI, S.G.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **R. Univ. Rural**, serie ciências da vida, 22: 65-81, 2002.
- MERCANTE, F.M.; TEIXEIRA, M.G.; ABOUD, A.C.S.; FRANCO, A.A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. **R. Univ. Rural**: sér.ci. vida, 21: 127-146, 1999.
- MILLER, J.H. (Ed.). **Experiments in molecular genetics**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 468p.

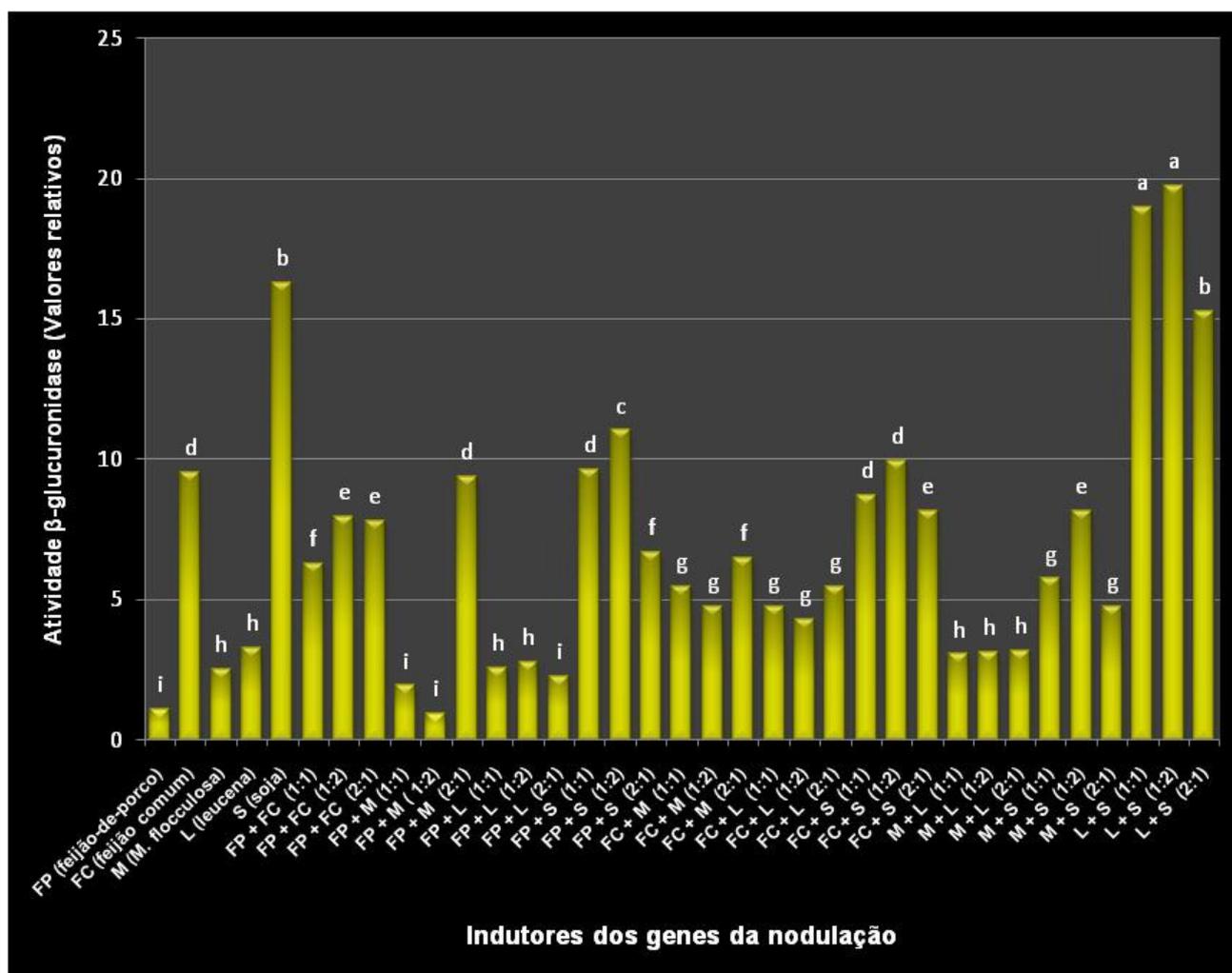
PETERS, N.K.; LONG, S.R. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Plant Physiol.** 82: 7379-7383, 1986.

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Soil Biol. Biochem.** 39: 1851-1864, 2007.

ROSSEN, L.; DAVIS, E.O.; JOHNSTON, A.W.B. Plant-induced expression of Rhizobium genes involved in host specificity and early stages of nodulation. **Trends Biochem. Sci.** 12: 430-434, 1987.

VINCENT, J.M.A. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** London, International Biological Programme, 1970. 170p.

ZAAT, S.A.; SCHRIJPEMA, J.; WIJFFELMAN, C.A.; BRUSSEL, A.A.N.; LUGTENBERG, B.J.J. Analysis of the major inducers of the Rhizobium nod A promoter from vicia sativa root exudate and their activity with different nodD genes. **Plant Mol. Biol.** 13: 175-188, 1989.



**Figura 1** – Atividade da enzima β-glucuronidase, resultante da indução dos genes *nod* da estirpe CIAT 899/pGUS 32, pela presença de exsudatos de sementes de diferentes espécies leguminosas. Valores relativos ao controle (culturas de bactérias na ausência de indutores - exsudatos de sementes). Os valores referentes aos controles são iguais a 1,0. Letras diferentes sobre as barras indicam contraste pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.