

Fatores que controlam a especificidade na interação rizóbio-leguminosa no estabelecimento da fixação biológica de nitrogênio

CARVALHO, GESIELE A.B.^{1,2}; HUNGRIA, MARIANGELA² ¹Universidade Estadual de Londrina, Dep. de Bioquímica e Biotecnologia. Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná. ²Embrapa Soja, Caixa Postal, 231, 86001-970, Londrina, Paraná.
e-mail: gesiele@cnpso.embrapa.br

Introdução

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo muito importante para a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), que se mostra eficiente, podendo suprir todo o nitrogênio necessário para o bom desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, para a obtenção de altos rendimentos, com baixo custo. Esse processo resulta do estabelecimento simbiótico entre a leguminosa e as bactérias pertencentes principalmente às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*, conhecidas coletivamente como rizóbios. Para o estabelecimento dessa associação simbiótica um grau elevado de especificidade está envolvido (HUNGRIA, 1994). O simbionte e a planta hospedeira comunicam-se pela troca de sinais moleculares, que agem através da indução ou repressão da expressão de genes envolvidos na nodulação, ou na atividade dos produtos desses genes (HUNGRIA, 1994). Interações planta-microrganismos diferem notavelmente na natureza de relações que são estabelecidas. Em interações prejudiciais às plantas, elas desenvolvem um mecanismo de defesa contra o patógeno. Entretanto, como na interação simbiótica os dois organismos envolvidos são beneficiados, o mecanismo de defesa da planta é suprimido (MITHÖFER, 2002). Por isso, um estabelecimento simbiótico de sucesso requer uma seqüência de eventos altamente regulados e coordenados (SCHULZE; KONDOROSI, 1998). Assim, a colonização dos tecidos radiculares da planta hospedeira pelos rizóbios, geralmente não provoca reações de defesa que são normalmente induzidas por microrganismos invasores, embora algumas etapas da infecção assemelhem-se a uma interação patogênica (BARON; ZAMBRYSKI, 1995).

A presença de compostos específicos derivados dos rizóbios pode suprimir a resposta de defesa do tecido vegetal e permitir que o hospedeiro seja colonizado. Esses compostos podem incluir exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS) e β -glucanos cíclicos ou derivados dessas moléculas. Esses efeitos são específicos e, provavelmente, restrito às interações hospedeiro-rizóbios, o que implica na existência de receptores específicos da planta envolvidos no reconhecimento de sinais (MITHÖFER, 2002). Em plantas há a hipótese de que as lectinas, proteínas de ligação, sejam responsáveis por mediar pelo menos parcialmente a especificidade na simbiose. Com isso, uma quantidade considerável de dados indicam que os polissacarídeos presentes na superfície celular dos rizóbios vinculam-se às lectinas. Essas servem como uma espécie de dispositivo que facilita a entrada do microrganismo no tecido vegetal (HIRSCH, 1999). Portanto, visto que para a ocorrência do processo de infecção das raízes de soja, inúmeros fatores estão envolvidos, o objetivo do trabalho foi através da construção de bibliotecas subtrativas, identificar lectinas que pudessem ser diferencialmente expressas no contato com os rizóbios.

Materiais e Métodos

Sementes de soja, cultivar Conquista, foram cultivadas em sacos plásticos com 200 mL contendo solução nutritiva isenta de N (BROUGHTON; DILWORTH, 1970); o conjunto foi esterilizado. O inoculante foi preparado com a estirpe CPAC 15 (=SEMIA 5079) de *B. japonicum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada uma constituída de 20 plantas por tratamento. Os tratamentos foram: (T1) inoculado (raízes de soja inoculadas com *B. japonicum* aos 3 dias após a emergência) e (T2) controle (raízes de soja não inoculadas). Após dez dias de inoculação foi realizada a coleta das raízes. Em seguida, procedeu-se à extração do RNA total, o isolamento do mRNA e, posteriormente, à do cDNA. Com o pool do cDNA resultante foi construída a biblioteca subtrativa (kit Clontech), de acordo com instruções do fabricante. Essa técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH) foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996) e se baseia na amplificação por PCR de sequências que são expressas diferencialmente, enquanto que a amplificação de outras sequências é suprimida. A seguir, as sequências foram amplificadas exponencialmente e submetidas ao sequenciamento com a tecnologia Genome Analyzer GAII (Illumina). As sequências resultantes foram montadas e anotadas automaticamente por meio de ferramentas de bioinformática.

Resultados e Discussão

A montagem da biblioteca de genes diferencialmente expressos nas raízes de soja durante o momento da infecção com o rizóbio resultou em 3.776 transcritos. Dentre esses, através de buscas por palavras-chave foi possível identificar transcritos que possivelmente codifiquem lectinas (Tabela 1), sendo que essas podem estar envolvidas no reconhecimento da bactéria. Com as sequências no formato FASTA desses transcritos foi feito o BLAST contra o banco de dados Phytozome, genoma da soja, apresentando um score e um e-value (Tabela 1) que aumentam a possibilidade de codificarem lectinas.

Tabela 1. Alguns transcritos identificados que podem codificar lectinas.

Gene	NCBI Id	Blast Phytozome	
		Score	e-value
Glyma07g01250.1	gi 124360385	1031.0	0.0
Glyma06g40240.1	gi 224122978	6507.8	0.0
Glyma08g46680.1	gi 224114125	2311.4	0.0
Glyma11g09450.1	gi 255575267	2217.6	0.0

Conclusões

Com o uso de diversas ferramentas de bioinformática foi possível identificar lectinas que podem estar envolvidas no reconhecimento do rizóbio pela planta. O intuito desse estudo foi selecionar genes que possivelmente reconheçam a simbiose como um processo benéfico para a cultura da soja. Assim a partir dessa seleção de lectinas, outros estudos poderão ser conduzidos.

Referências

- BARON, C.; ZAMBRYSKI, P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations of a common theme? **Annual Review Genetics**, v. 29, p. 107–129, 1995.
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Methods in legume-rhizobium technology: plant nutrient solutions. In: SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. (Ed.). **Handbook for Rhizobia**. Hawaii: NifTAL Project and University of Hawaii, 1970, p. 245–249.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, 1996.
- HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320–326, 1999.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 3, p. 339-364, 1994.
- MITHÖFER, A. Suppression of plant defence in rhizobia–legume symbiosis. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 440-444, 2002.
- SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review Genetics**, v. 32, p. 33–57, 1998.