



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC* E *NODG* DE  
*RHIZOBIUM TROPICI* SOB INDUÇÃO COM FLAVONÓIDES  
PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO**

---

Londrina  
2009

LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC* E *NODG* DE  
*RHIZOBIUM TROPICI* SOB INDUÇÃO COM FLAVONÓIDES  
PELA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mariangela Hungria  
Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup> Francismar Corrêa Marcelino

Londrina  
2009

LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *NODC* E *NODG* DE  
*RHIZOBIUM TROPICI* SOB INDUÇÃO COM FLAVONÓIDES PELA  
TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mariangela Hungria da Cunha  
Orientadora – Embrapa Soja/UEL

---

Dr<sup>ª</sup> Francismar Corrêa Marcelino  
Embrapa Soja

---

Dr<sup>ª</sup> Elisete Pains Rodrigues  
Embrapa Soja

Londrina, 29 de junho de 2009

Aos meus pais  
Aos meus irmãos  
Aos meus sobrinhos  
Ao meu amor, Yudi  
com amor

**DEDICO**

“Todo o bem que eu puder fazer,  
toda a ternura que eu puder demonstrar a  
qualquer ser humano,  
que eu os faça agora, que não os adie ou  
esqueça, pois não passarei duas vezes pelo  
mesmo caminho.”

(James Greene)

## AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos e muitas vezes, um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

De uma maneira geral gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente.

À Deus por ter me concedido a vida, a oportunidade de estudar e a força para vencer todos os obstáculos.

Agradeço de coração a todos os meus familiares, em especial meus queridos pais José Adelino e Maria Aparecida, meus queridos irmãos José Adelino, Silvia (minha irmã gêmea) e Marilice, minha cunhada Juliana e meus lindos sobrinhos Isabela e Diogo. Obrigada por compreenderem todos os momentos de ausência e por todo o apoio que sempre me deram.

Meus queridos pais eu gostaria de agradecer de uma maneira especial pelo exemplo de vida que sempre me deram, me mostrando que mesmo com todo o sofrimento que passaram nesta vida continuaram lutando e enfrentando todas as dificuldades com esforço, muito esforço, trabalho, paciência, dedicação, fé, coragem, amor, não desistindo nunca quando os obstáculos surgiam. Que desde sempre inculcaram-me os valores, princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei. Pela motivação, compreensão e força, com que sempre me acompanharam. Por sempre acreditarem e me fazerem acreditar que sou capaz. Pelo amor incondicional. Vocês são tudo na minha vida. Meu amor e eterno agradecimento.

Com um carinho muito especial eu agradeço ao meu namorado Yudi, pelo apoio, carinho, amor, amizade, paciência, dedicação. Obrigado por me ouvir nos meus desabafos, compreender os momentos de ausência e pelas palavras de incentivo, sempre.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Mariangela Hungria, pela oportunidade. Mesmo sem me conhecer, ter me aceitado orientar; pela confiança e profissionalismo demonstrados. Por não medir esforços para ajudar seus alunos, mesmo na correria do seu dia a dia.

À Dr<sup>a</sup> Francismar Corrêa Marcelino, pela co-orientação neste trabalho, tendo paciência em dirimir minhas dúvidas; pela amizade, além de orientadora.

Ao Dr<sup>o</sup> Marco Antônio Nogueira, membro da banca de defesa de projeto e ao Dr<sup>o</sup> Fernando Gomes Barcellos, membro da banca de defesa de projeto e qualificação. Obrigado pelas críticas e sugestões.

À Lígia, técnica do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja, pelos ensinamentos e incentivos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa, e mesmo aqueles que não estão mais no laboratório: Maria, Adalgisa, Glaciela, Odair, Pâmela, Susan, Jesiane, Adriana, Simone, Fabinho, Renan Ribeiro, Renan Oliveira, Nágila, Leny, Letícia, Renata, Ilmara, Aline, André, Gesiele, Rinaldo, Dona Rosa, Sueli. Pela amizade, carinho e ajuda. Àqueles que me deram forças nos momentos mais difíceis e estiveram sempre à disposição, em todos os momentos. Vou guardar pra sempre em meu coração. Todos os momentos de descontração foram fundamentais para que as minhas forças fossem restabelecidas.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, em especial à Silvana e ao César, pela ajuda, por terem permitido com que eu utilizasse o nanodrop<sup>®</sup>, além de me fornecerem vários reagentes para que eu conseguisse concluir meus experimentos. Muito obrigado.

À Dr<sup>a</sup> Elisete Pains Rodrigues, pelo exemplo de profissional, sempre disposta a ajudar os colegas, pelas ótimas sugestões, dicas, orientações. Pela amizade, por ter sempre me incentivado e ajudado. Muito obrigado.

Às minhas amigas Joyce, Rafaela e Bianca, pelos momentos de descontração e amizade.

Aos membros da banca examinadora: Dr<sup>a</sup> Francismar Corrêa Marcelino e Dr<sup>a</sup> Elisete Pains Rodrigues pela disponibilidade em participar da banca de defesa desta dissertação e pelas valiosas contribuições durante o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da UEL, pelo conhecimento transmitido e ao apoio concedido.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À EMBRAPA Soja, pela oportunidade de estágio e bolsa de estudos durante o primeiro ano de estágio, pela estrutura que me foi concedida para a realização dos experimentos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Meu muito obrigado!

OLIVEIRA, LUCIANA RUANO DE. **Análise da expressão dos genes *nodC* e *nodG* de *Rhizobium tropici* sob indução com flavonóides pela técnica de PCR quantitativo.** 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

## RESUMO

O estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa inicia-se com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos de ação quimiotática sobre o rizóbio, facilitando a colonização rizosférica e estimulando o crescimento da bactéria. Geralmente, estes compostos excretados são açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos, que promovem a adesão dos rizóbios aos pelos radiculares das plantas. Simultaneamente a esta adesão, tem início uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, que libera compostos fenólicos, principalmente flavonóides, responsáveis pela indução da transcrição de genes bacterianos essenciais à nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*). Os rizóbios produzem, então, por meio dos genes de nodulação, os fatores de nodulação (fatores Nod), que são oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) que induzem modificações radiculares no estágio de pré-infecção, essenciais à infecção do rizóbio para a formação do nódulo e posterior fixação do nitrogênio (N<sub>2</sub>). O gene *nodC* é responsável pela biossíntese da estrutura básica do fator Nod, mais especificamente, é responsável pelo controle da etapa de alongação da cadeia principal oligossacarídica. Já o gene *nodG* é um gene específico do hospedeiro (*hsn*), responsável pela modificação no esqueleto oligossacarídico do fator Nod. Neste estudo foi relatada a resposta transcricional dos genes *nodC* e *nodG* na estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*, após indução com naringenina e exsudato de sementes de feijão, pela técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR). Deste modo, diferentes tratamentos de indução dos genes *nod* foram realizados. No primeiro experimento, os genes *nodC* e *nodG* foram induzidos com naringenina ou exsudato de sementes de feijão por um período de 48 h. Já no segundo experimento, após as células bacterianas atingirem a fase exponencial de crescimento, foi realizado o processo de indução dos genes *nod*, sendo aplicados os seguintes tempos: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h. Em seguida, procedeu-se à extração do RNA total de todas as culturas. Os níveis de expressão gênica diferencial foram calculados aplicando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) e a análise dos dados foi feita por estatística descritiva, onde a reprodutibilidade e precisão dos valores de RQ obtidos foram estimados pelos desvios padrão (SD) e coeficiente de variação (CV%) em cada corrida e entre as corridas. Também foi utilizado o programa REST 2008 (Relative Expression Software Tool), versão 2.0.7 (Pfaffl et al., 2002; <http://www.gene-quantification.info>), o qual testa as diferenças para significância através de um teste randômico, baseado em iterações. Em todas as reações foi utilizado o gene ribossômico 16S como normalizador. Os resultados da quantificação relativa mostraram que, após 5 min de incubação, ambos os genes foram significativamente induzidos pelo exsudato, com valores 121,97 e 14,86 superiores ao controle, respectivamente. Níveis de expressão inferiores foram observados na presença de naringenina, além disso, a expressão máxima na presença desse indutor foi verificada somente após 8 h de incubação. Esses resultados sugerem que o exsudato de sementes de feijão revelam maior potencial para uma imediata indução dos genes *nod* em *R. tropici* PRF 81.

**Palavras-chave:** Genes de nodulação. Expressão gênica. Fixação biológica do nitrogênio. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium tropici*. RT-qPCR. Simbiose.

OLIVEIRA, LUCIANA RUANO DE. **Analysis of the expression of *nodC* and *nodG* genes of *Rhizobium tropici* after induction with flavonoids by the quantitative PCR technique (RT-qPCR)**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

## ABSTRACT

The establishment of rhizobia-legume symbiosis begins with the excretion by the host plant of compounds with chemotactic activity to the rhizobia, facilitating the rhizospheric colonization and stimulating bacterial growth. In general these excreted compounds are sugars, amino acids and dicarboxylic acids that promote the attachment of the rhizobia to the plant root hairs. Simultaneously to this attachment, an exchange of molecular signals between the microsymbiont and the host plant starts, with the plant releasing phenolic compounds, mainly flavonoids, responsible for the induction of the transcription of bacterial nodulation genes (*nod*, *nol* and *noe* genes). Following, rhizobia releases the nodulation factors (Nod factors) that are lipochitin oligosaccharides (LCOs) responsible for the changes in the early stages of the root infection, facilitating the infection of rhizobia that will lead to nodule formation and nitrogen fixation. The *nodC* gene is responsible for the biosynthesis of the basic structure of the Nod factor, more specifically, it is responsible for controlling the elongation of the oligosaccharides backbone. The *nodG* gene is a host-specific gene (*hsn*), responsible for modification in the oligosaccharide backbone of the Nod factor. This study reports the transcriptional response of *nodC* and *nodG* genes of strain PRF 81 of *Rhizobium tropici*, after induction with naringenin and common bean exudate, evaluated by the quantitative PCR technique (RT-qPCR). Different gene induction treatments were applied. In the first experiment, *nodC* and *nodG* genes were induced with naringenin or seed exudates by 48 h. In the second experiment, after bacterial cells reached the exponential phase of growth, induction was achieved by the incubation with naringenin or seed exudates in different periods of time: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h. Following, total RNA was extracted from all cultures. The levels of differential gene expression were estimated by the method of  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) and the analyses of the data was performed by using descriptive statistics, with the reproducibility and precision of the RQ values being estimated by the standard deviation (SD) and the coefficient of variation (CV%) obtained in each assay and among the assays. The REST 2008 (Relative Expression Software Tool), versão 2.0.7 (Pfaffl et al., 2002; <http://www.gene-quantification.info>) was also used, to test the statistical significance by means of a random test base on interactions. In all reactions the 16S rRNA gene was used as a normalizer. The results of relative quantification have shown that, after 5 min of incubation, both genes were significantly induced by the exudates, with values of 121,97- and 14,86-fold higher than the control, respectively. Lower levels of expression were observed in the presence of naringenin; furthermore, maximum expression in the presence of this inducer was verified only after 8 h of incubation. These results suggest that common bean seed exudates have a higher potential for a prompt induction of *nod* gene in *R. tropici* strain PRF 81.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. Gene expression. Nodulation genes. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium tropici*. RT-qPCR. Symbiosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Genes de nodulação (*nod*) de (a) *R. leguminosarum* bv. *viciae* (plasmídeo pRLJI) e (b) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (plasmídeo pRtr ABU841). Os genes são representados por setas que apontam a direção da sua transcrição. Os genes *nod* “comuns” estão representados pelas setas pretas e os específicos dos hospedeiros (*hsn*) pelas setas hachuradas (alguns autores, como Long, 1992, e Phillips, 1992, não consideram os genes *nodI* e *nodJ* como “comuns”). As setas brancas representam os genes regulatórios *nodD* e os triângulos indicam a posição das caixas “*nod*” (Dénarié et al., 1992; Schlaman et al., 1992b; Spaink, 1992)..... 24
- Figura 2** – Rota biossintética para formação da estrutura básica de um fator de nodulação ... 29
- Figura 3** – Níveis de expressão dos genes *nodC* e *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetidos ao tratamento de indução com naringenina e exsudato de sementes de feijão durante 48 h de indução, comparados com os respectivos controles (metanol e água; utilizados como calibradores na RT-qPCR). Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão ..... 46
- Figura 4** – Níveis de expressão do gene *nodC*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h, comparados com o controle, água, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão..... 48
- Figura 5** – Níveis de expressão do gene *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h, comparados com o controle, água, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão..... 48
- Figura 6** – Níveis de expressão do gene *nodC*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com naringenina (1,5 µM) nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8h , comparados com o controle, metanol, utilizado como calibrador na RT-qPCR . Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão ..... 50
- Figura 7** – Níveis de expressão do gene *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com naringenina (1,5 µM) nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8h , comparados com o controle, metanol, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão ..... 50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Genes de nodulação cujas principais funções são conhecidas .....	25
<b>Tabela 2</b> – Indutores dos genes <i>nod</i> isolados de leguminosas.....	26
<b>Tabela 3</b> – Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para RT-qPCR.....	34
<b>Tabela 4</b> – Estatística descritiva baseada nos níveis de expressão dos genes <i>nodC</i> e <i>nodG</i> tratados com exsudato de sementes de feijão em todos os tempos de indução. Cada amostra foi amplificada em triplicata à partir de 3 repetições biológicas independentes.....	41
<b>Tabela 5</b> – Estatística descritiva baseada nos níveis de expressão dos genes <i>nodC</i> e <i>nodG</i> tratados com naringenina (1,5 µM) em todos os tempos de indução. Cada amostra foi amplificada em triplicata à partir de 3 repetições biológicas independentes.....	44
<b>Tabela 6</b> – Análise estatística dos resultados de expressão relativa, pelo programa REST 2008 (versão 2.0.7), dos genes <i>nodC</i> e <i>nodG</i> submetidos ao tratamento com exsudato de sementes de feijão e naringenina, em todos os tempos de tratamento, normalizados pelo gene referência RNA 16S .....	45
<b>Tabela 7</b> – Análise estatística dos resultados de expressão relativa, pelo programa REST 2008 (versão 2.0.7), dos genes <i>nodC</i> e <i>nodG</i> submetidos ao tratamento com exsudato de sementes de feijão e naringenina, em todos os tempos de tratamento, normalizados pelo gene referência rRNA 16S.....	49

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 A CULTURA DO FEJÓEIRO (PHASEOLUS VULGARIS L.).....	16
1.3 A IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO .....	17
1.4 SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA E OS PROCESSOS DE INFECÇÃO E NODULAÇÃO DAS RAÍZES DE FEJÓEIRO .....	19
1.5 GENES RIZOBIANOS RESPONSÁVEIS PELO CONTROLE DOS PROCESSOS DE INFECÇÃO, NODULAÇÃO E ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA .....	21
1.6 GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DO FATOR NOD .....	26
1.7 SINAIS MOLECULARES LIBERADOS EM EXSUDATOS DE PLANTAS HOSPEDEIRAS.....	29
1.8 SINAIS INDUTORES DOS GENES DE NODULAÇÃO DO RIZÓBIO.....	30
1.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
<b>2 OBJETIVO</b> .....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1 ESTIRPE BACTERIANA .....	37
3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	37
3.2.1 Indução dos Genes de Nodulação (NOD) .....	38
3.2.2 Experimento 1 .....	38
3.2.3 Experimento 2 .....	38
3.3 PREPARO DO FLAVONÓIDE E DO EXSUDATO DE SEMENTES DE FEIJÃO .....	39
3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL.....	39
3.5 DESENHO DOS PRIMERS PARA RT-QPCR.....	39
3.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	41
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4 RESULTADOS</b> .....	42
4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES NODC E NODG EM RHIZOBIUM TROPICI PRF 81 DURANTE A INDUÇÃO POR NARINGENINA E EXSUDATOS DE SEMENTES DE FEIJÃO .....	43

<b>5 DISCUSÕES</b> .....	51
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	70
<b>ANEXOS A</b> .....	71

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais importante para a nutrição humana no Brasil, tendo em vista que o feijão é um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro. É fonte de proteína vegetal e, também, de aminoácidos essenciais, representando uma das principais fontes de proteínas da dieta de populações menos favorecidas (COSTA; VIEIRA, 2000b). O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do mundo.

Em condições limitadas de nitrogênio, bactérias pertencentes a diversos gêneros, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, coletivamente denominadas como rizóbios, são capazes de estabelecer simbiose com espécies de plantas pertencentes à família Leguminosae, formando estruturas altamente especializadas, denominadas de nódulos, em cujo interior, posteriormente, irá ocorrer a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; HUNGRIA; STACEY, 1997; BRENCIC; WINANS, 2005; STACEY et al., 2006). O processo da nodulação radicular inicia-se com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos que agem como substâncias quimiotáticas e estimulam a multiplicação das bactérias na rizosfera (HUNGRIA, 1994). Geralmente, estes compostos excretados são açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos, que promovem a adesão dos rizóbios aos pelos radiculares das plantas, um processo relativamente estável e irreversível. Simultaneamente a essa adesão, ocorre uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, que libera compostos fenólicos, especialmente flavonóides, além de outras moléculas, como as betaínas (não pertencentes à família dos flavonóides), que induzem a transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias (HUNGRIA ET AL., 1997; BRENCIC; WINANS, 2005; PINTO, 2007). A seguir, ocorre a síntese e a liberação, pelo rizóbio, de pequenas moléculas que são percebidas pela planta e que, por conseguinte, ativam o processo de formação do nódulo. Essas moléculas são chamadas de fatores Nod, também conhecidos como lipo-quito-oligossacarídeos (LCOs) (BRENCIC; WINANS, 2005) e são responsáveis pelas modificações radiculares na planta no

pré-estágio de infecção, culminando com a formação dos nódulos fixadores de nitrogênio (N<sub>2</sub>).

Uma imediata indução dos genes *nod* é considerada essencial para o início do processo de infecção pelo rizóbio. Os flavonóides exsudados por sementes e raízes de uma determinada leguminosa consistem de uma mistura de indutores dos genes *nod* fracos e fortes, além de compostos inibidores e ineficazes (MULLIGAN; LONG, 1985; FIRMIN et al., 1986; PETERS et al., 1986; REDMOND et al., 1986; HARTWIG et al., 1989, 1990; HUNGRIA et al., 1992). No caso do feijoeiro, o principal grupo de compostos indutores liberados pelas sementes foi identificado como antocianidinas (delfinidina, petunidina e malvidina) e flavonóis (miricetina, quercetina e canferol) (HUNGRIA et al., 1991a). Nos exsudatos radiculares foram identificados eriodictiol, naringenina e genisteína como os principais indutores (HUNGRIA et al., 1991b). Bolanões-Vásquez & Werner (1997) identificaram outros compostos flavonóides indutores dos genes *nod* em exsudatos radiculares de feijoeiro, a chalcona isoliquiritigenina, e a correspondente flavanona liquiritigenina.

Não existem estudos de expressão gênica da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*, portanto, torna-se necessário verificar se o flavonóide naringenina e exsudato de sementes de feijão são capazes de induzir a expressão dos genes *nod*.

Além disso, a maioria dos estudos de expressão dos genes *nod*, baseados na indução desses genes pelos flavonóides indutores, reportados na literatura, são obtidos através das construções de “plasmídeos repórteres”, as quais permitem monitorar a expressão dos genes *nod* através da atividade da enzima β-galactosidase (INNES et al., 1985; MULLIGAN; LONG, 1985; ROSSEN et al., 1985; ZAAT et al., 1987b). Existem poucos estudos utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para verificar a expressão de genes de nodulação (*nod*) em rizóbios. Dentro deste contexto, investigou-se o potencial indutor do flavonóide naringenina e de exsudato de sementes de feijão na expressão dos genes *nodC* e *nodG* de *R. tropici* PRF81, através da técnica de RT-qPCR.

Estes estudos podem fornecer informações valiosas para a compreensão dos mecanismos envolvidos na simbiose entre o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e seu microssimbionte *R. tropici*, e conseqüentemente permitir o desenvolvimento de estratégias que possam elevar a FBN nessa leguminosa e aumentar os rendimentos.

## 1.2 A CULTURA DO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais importante para a nutrição humana, tendo em vista que o feijão é um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro. É fonte de proteína vegetal e, também, de aminoácidos essenciais, representando uma das principais fontes de proteína da dieta de populações menos favorecidas (COSTA; VIEIRA, 2000b).

Graças às suas comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, o feijão é altamente desejável como componente em dietas de combate à fome e à desnutrição. Além do seu conteúdo proteico, o elevado teor de fibra alimentar, com seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, aliado às vitaminas (especialmente do complexo B) e aos carboidratos, tornam o seu consumo altamente vantajoso como alimento funcional, representando uma fonte importante de nutrientes, de energia e atuando na prevenção de distúrbios cardiovasculares e certos tipos de câncer (COSTA; VIEIRA, 2000b; EMBRAPA, 2007a).

O feijoeiro é originário das Américas, com dois centros de diversificação genética: o Mesoamericano ou grupo norte (do México à região norte da América do Sul) e o Andino ou grupo sul, que abrange o sul do Peru até o norte da Argentina. Além desses centros primários, um terceiro centro menor de domesticação pode existir na Colômbia (GEPTS, 1990; KAMI et al., 1995).

Entre as espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*), o *P. vulgaris* é a mais plantada, sendo responsável por cerca de 95% da produção mundial de *Phaseolus* (COSTA; VIEIRA, 2000a).

O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do mundo. Conforme publicação do quinto levantamento da safra 2008/09, realizada em fevereiro de 2009 pela Companhia Nacional de Abastecimento - Conab, a área plantada de feijão aumentou de 3.993,4 mil hectares (ha), em 2007/08, para 4.141,4 mil ha, em 2008/09. A análise dos dados de produção, referentes ao mesmo período, mostra um aumento mínimo de 3.521,9 mil toneladas, em 2007/08, para 3.588,2 mil toneladas em 2008/09. A produtividade aponta um decréscimo de 882 kg ha<sup>-1</sup> para 866 kg ha<sup>-1</sup>. Esses dados referem-se às três safras que compõem o ciclo da cultura ao longo do ano (CONAB, 2009).

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo território nacional e, dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas.

A primeira, também conhecida como safra das “águas”, ocorre entre agosto e dezembro e concentra-se mais nos estados da Região Sul; a segunda safra, ou da “seca”, abrange todos os estados brasileiros e ocorre entre janeiro e abril; a terceira safra, ou de “inverno”, concentrada nas Regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e no Estado da Bahia, é realizada de maio até julho ou agosto, dependendo do estado. Dessa forma, durante todo o ano, em alguma região do país sempre haverá produção de feijão (COSTA; VIEIRA, 2000a). É reconhecida como cultura de subsistência, uma vez que grande parte da produção está ligada a pequenas e médias propriedades, geralmente utilizando baixo nível tecnológico, apresentando importância destacada nos sistemas produtivos vinculados à agricultura familiar (EMBRAPA, 2007b).

O baixo nível de tecnologia e o cultivo em solos marginais, especialmente com baixo teor de nitrogênio (N), contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro, representando um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos nacionais (HUNGRIA et al., 1997; 2003; PINTO, 2007). Nesse contexto, o suprimento adequado de N pela simbiose com bactérias diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, contribuindo para a manutenção da fertilidade do solo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão dos gases com efeito estufa (HUNGRIA et al., 1997, 2003; EMBRAPA, 2007c). De fato, já foi constatado que, com a utilização de cultivares e estirpes mais adequadas, aliada às condições ambientais favoráveis, o feijoeiro pode obter N proveniente da FBN em quantidades comparáveis às das plantas recebendo fertilizante nitrogenado (HUNGRIA et al., 2000; 2003).

### 1.3 A IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O N é o quarto elemento mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono (C), pelo oxigênio (O<sub>2</sub>) e pelo hidrogênio (H<sub>2</sub>). É constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e da clorofila (MORGANTE, 2003), estando presente na natureza como nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>), íons de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), amônia (NH<sub>3</sub>) ou incorporado em compostos orgânicos nitrogenados (DROZDOWICZ, 1997; PINTO, 2007).

Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de N<sub>2</sub>, constituindo aproximadamente 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo

diretamente como nutriente, devido à ausência do aparato enzimático responsável em quebrar a tripla ligação existente entre os dois átomos de N, que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza (ARAÚJO; CARVALHO, 2006; HUNGRIA et al., 2007; PINTO, 2007).

As principais fontes para fornecimento de N para as plantas são: 1) o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2) a fixação não-biológica; 3) os fertilizantes nitrogenados; e 4) o processo de FBN do  $N_2$ .

Em relação ao N do solo, o reservatório desse nutriente presente na matéria orgânica é limitado, podendo ser esgotado, rapidamente, após alguns cultivos.

A fixação não-biológica, isto é, independente da ação de organismos vivos, resulta de processos naturais, como a reação de descargas elétricas com o  $N_2$ , a combustão e o vulcanismo. Essa fonte, porém, contribui com apenas cerca de 10% da entrada anual de N na terra.

Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez e com menor custo energético pelas plantas, porém, com custos econômico e ambiental elevados. O processo industrial que transforma o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) requer: hidrogênio (derivado de gás de petróleo); catalisador contendo ferro; altas temperaturas ( $300^\circ$  a  $600^\circ$ ); e altas pressões (200 a 800 atm). Desse modo, o gasto equivalente de fontes energéticas por tonelada de amônia sintetizada é de, aproximadamente, seis barris de petróleo. Um agravante na utilização dos fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 50%. Deve-se considerar, ainda, que os fertilizantes nitrogenados estão altamente relacionados à poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas, particularmente nitrato, nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Em termos globais, estima-se que a produção industrial da amônia contribua com, aproximadamente, 25% das entradas de N na terra.

A terceira fonte de N para as plantas é representada pela FBN, a qual representa a principal via de incorporação do N à biosfera (HUNGRIA et al., 2001, 2007; PINTO, 2007). Na FBN há redução do  $N_2$  em  $NH_3$ , a mesma forma obtida pelo processo industrial, que será, posteriormente, utilizada para a síntese de compostos orgânicos nitrogenados. Esse processo é realizado pelas bactérias fixadoras de N, também denominadas como diazotróficas, as quais adquiriram, durante sua evolução, a capacidade de sintetizar a nitrogenase, uma enzima capaz de romper a tripla ligação do  $N_2$  (DROZDOWICZ, 1997).

A maior contribuição do processo de FBN ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae com bactérias pertencentes a diversos gêneros, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, coletivamente denominadas como rizóbios (HUNGRIA et al., 2007).

A FBN representa um componente essencial para a sustentabilidade da agricultura (DIXON; KAHN, 2004; PINTO, 2007), tanto que inoculantes rizobianos têm sido aplicados, freqüentemente, como biofertilizantes. Os inoculantes são produtos desenvolvidos a partir de bactérias do solo capazes de estabelecer uma associação com as plantas e possibilitar o fornecimento de N a elas. São compostos de um veículo esterilizado, geralmente turfa (um tipo de solo orgânico) ou outro material semelhante, e grande quantidade de bactérias específicas para cada espécie de leguminosa, sendo misturado às sementes no momento da semeadura (EMBRAPA, 2007d). A tendência moderna no cultivo de leguminosas é o uso cada vez mais intenso do inoculante, por ser um produto natural, de alta eficiência e com uma relação custo/benefício muito favorável para o lado do benefício.

Estima-se que o processo biológico contribua com cerca de 65% de todas as entradas de N, sendo o maior provedor desse nutriente para a manutenção da vida na terra (HUNGRIA et al., 2001).

Os teores de N nos solos brasileiros são baixos, de modo que, para garantir o rendimento da cultura do feijoeiro, é necessário fornecer esse nutriente, seja através do uso de fertilizantes ou pelo processo de FBN. A contribuição do processo de FBN representa, portanto, uma alternativa de baixo custo, protetora do meio ambiente e com uma grande contribuição para o tipo de manejo que hoje é buscado mundialmente, o de uma agricultura sustentável (PINTO, 2007).

#### 1.4 SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA E OS PROCESSOS DE INFECÇÃO E NODULAÇÃO DAS RAÍZES DE FEIJOEIRO

Em condições limitadas de N, os rizóbios são capazes de estabelecer simbiose com espécies de plantas pertencentes à família Leguminosae, formando estruturas altamente especializadas, denominadas de nódulos, em cujo interior, posteriormente, irá ocorrer a FBN (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; HUNGRIA; STACEY, 1997; BRENCIC;

WINANS, 2005; STACEY et al., 2006). Essa associação planta-bactéria é tida como simbiótica, uma vez que o N fixado pelos microrganismos é assimilado pelas plantas, enquanto estas fornecem fontes de C para o simbionte (STRALIOTTO; TEIXEIRA, 2000); Essa interação é, de um modo geral, específica para cada leguminosa hospedeira (HUNGRIA, 1994; STACEY et al., 2006).

A formação dos nódulos é um processo complexo que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira, como na bactéria. As alterações na bactéria visam, especialmente, o recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover ATP e poder redutor, necessários para o processo de FBN, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias. O processo da nodulação radicular inicia-se com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos que agem como substâncias quimiotáticas e estimulam a multiplicação das bactérias na rizosfera (HUNGRIA, 1994). Geralmente, estes compostos são açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos, que promovem a adesão dos rizóbios aos pelos radiculares das plantas, um processo relativamente estável e irreversível. Esse processo ocorre em duas etapas: na primeira, as bactérias isoladas aderem à superfície radicular e, em seguida, outras bactérias aderem às que estão presas aos pelos radiculares. Simultaneamente a essa adesão, ocorre uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, que libera compostos fenólicos, especialmente flavonóides, além de outras moléculas, como as betainas (não pertencentes à família dos flavonóides), que induzem a transcrição dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias (HUNGRIA et al., 1997; BRENCIC; WINANS, 2005; PINTO, 2007). Na segunda etapa da sinalização molecular, ocorre a síntese e a liberação, pelo rizóbio, de pequenas moléculas que são percebidas pela planta e que, por conseguinte, ativam o processo de formação do nódulo. Essas moléculas são chamadas de fatores Nod, também conhecidos como lipo-quito-oligossacarídeos (LCOs) (BRENCIC; WINANS, 2005) e são responsáveis pelas modificações radiculares no pré-estágio de infecção, como: formação de raízes curtas e grossas, deformação, encurvamento e aumento no número de pelos radiculares, seguidos por invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pelo radicular, que cresce da extremidade do pelo radicular encurvado em direção ao córtex, conduzindo o rizóbio para as células interiores (PINTO, 2007). Em associação à infecção ocorrem os processos de divisão das células do córtex e formação do primórdio do nódulo (HUNGRIA, 1994; HADRI et al., 1998; STACEY et al., 2006). Os cordões de infecção entram nas células desse primórdio, em cujo citoplasma as bactérias são liberadas e envoltas em uma membrana. Em seguida, os primórdios diferenciam-

se em nódulos – autênticos órgãos de especialização celular - dentro dos quais as bactérias se diferenciarão em bacteróides, formas capazes de fixar o N<sub>2</sub> (HUNGRIA, 1994; STACEY et al., 2006; PINTO, 2007). Nos bacteróides ocorre a síntese das enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do N<sub>2</sub> e com a assimilação do N fixado, dando início ao processo de FBN (HUNGRIA, 1994).

Atualmente, existem seis espécies de *Rhizobium* descritas capazes de nodular e fixar N<sub>2</sub> em feijoeiro: *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (JORDAN, 1984), *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. gallicum*, *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997) e *R. lusitanum* (VALVERDE et al., 2006).

Através de um programa de seleção de estirpes baseado na diversidade de rizóbios nativos, realizado pela Embrapa Soja e pelo IAPAR, foi possível a identificação da estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *R. tropici*, com alta eficiência de FBN, competitiva e estável geneticamente, além de ser tolerante às condições de altas temperaturas e acidez do solo. Por essas características, a estirpe vem sendo utilizada em inoculantes comerciais desde 1998, uma vez que se comprovou, em diversos ensaios a campo, a capacidade de aumentar o rendimento da cultura em até 906 kg ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA et al., 2000).

#### 1.5 GENES RIZOBIANOS RESPONSÁVEIS PELO CONTROLE DOS PROCESSOS DE INFECÇÃO, NODULAÇÃO E ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA

Os genes bacterianos essenciais à infecção e nodulação podem ser divididos em duas classes. Uma classe inclui os genes envolvidos na formação da superfície celular bacteriana, tais como os genes determinantes da síntese de exopolissacarídeos (genes *exo*), lipopolissacarídeos (genes *lps*), polissacarídeos capsular ou antígeno K, e 1,2-β-glucanos (genes *ndv*), relacionados ao desenvolvimento nodular. Mutações nesses genes podem afetar o processo de infecção em vários graus, como, por exemplo, incapacitando a formação dos cordões de infecção, o que resulta na formação de nódulos vazios não fixadores de N<sub>2</sub> (fenótipo Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup>). Um possível envolvimento dos genes *exo* e *lps* na determinação da especificidade hospedeira tem sido sugerido, porém, nenhuma evidência mais clara mostrou, ainda, que os componentes da superfície celular do rizóbio são os determinantes principais da especificidade hospedeira (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; MERCANTE et al., 2002).

A segunda classe consiste dos genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) (Tabela 1). Esta classe de genes divide-se em duas categorias, os genes *nod* comuns (*nodABC*) e os genes *nod* específicos do hospedeiro (*hsn*). A inativação dos genes desta classe pode resultar em vários fenótipos na planta, como ausência de nodulação (Nod<sup>-</sup>), nodulação tardia, porém efetiva (Nod<sup>d</sup> Fix<sup>+</sup>), ou uma mudança na especificidade do hospedeiro (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995).

Até recentemente, os genes comuns *nodABC* estavam presentes em todos os rizóbios estudados. Após quase duas décadas de estudos dos genes *nodABC*, porém, surgiu a revelação de que podem existir espécies de rizóbios capazes de nodular e fixar N<sub>2</sub> sem esses genes, conforme demonstrado pelo genoma completo da estirpe BTAi1 de *Bradyrhizobium* sp. (GIRAUD et al., 2007). Os genes *nodABC* não são expressos constitutivamente, sendo necessária a presença de um indutor para que haja sua expressão. Estes genes são estruturalmente conservados e funcionalmente transferíveis entre as espécies de rizóbios, sem alteração do reconhecimento do hospedeiro original (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; HUNGRIA; STACEY, 1997; MERCANTE et al., 2002), ou seja, possuem a capacidade de restituir funções de nodulação quando transferidos entre espécies diferentes de rizóbios (VALARINE, 1998).

A transcrição destes genes é essencial para a síntese da estrutura básica do fator Nod, o qual conduz às principais alterações na raiz da planta, necessárias à entrada do rizóbio no hospedeiro (KONDOROSI et al., 1989). Em muitas espécies, os genes *nodA*, *nodB* e *nodC* localizam-se no mesmo operon (*nodABC*) (Figura 1). Entretanto, em *R. etli*, o gene *nodA* encontra-se separado dos genes *nodBC* por 20 Kb (GIRARD et al., 1991; RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995).

Schlaman et al. (1992) classificam os genes *nodIJ* como *nod* comuns, já Phillips (1992), como genes específicos do hospedeiro (*hsn*). A proteína NodI apresenta sequência homóloga a uma família de ATPases de transporte possivelmente envolvidas na secreção de lipooligossacarídeos, como foi também demonstrado para a proteína NodJ (SPAINK et al., 1995).

Dentre outros genes de nodulação comuns à maioria dos rizóbios, podem-se citar os genes *nodMN*, descritos pela primeira vez por Baev et al. (1992), sendo requeridos para a otimização da nodulação em alfafa.

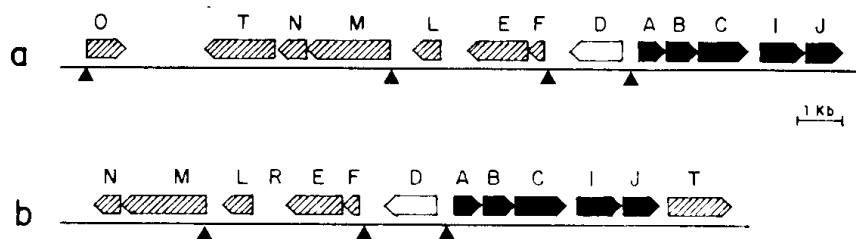
Os genes *hsn* constituem a maioria dos genes de nodulação descritos, sendo responsáveis pelas modificações no esqueleto oligossacarídico do fator Nod (PINTO, 2007). São necessários para a nodulação específica de cada planta hospedeira, não apresentando

homologia genética e/ou funcional entre as espécies de rizóbio (KONDOROSI et al., 1989). A maioria das mutações nesses genes resulta em alterações na nodulação ou modificações na faixa de especificidade hospedeira (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995).

Na maioria das espécies de *Rhizobium*, os genes que controlam a nodulação, a especificidade hospedeira e a fixação de N<sub>2</sub> estão localizados em um plasmídeo chamado plasmídeo simbiótico (pSym), como em *R. tropici* (PINTO, 2007). Ao contrário, em *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, esses genes estão em uma “ilha” simbiótica localizada no cromossomo bacteriano (SADOWSKY et al., 1991; KANEKO et al., 2000).

Em outra categoria dos genes *nod*, estão incluídos os genes classificados como “regulatórios”, como o *nodD*, que codifica proteínas conhecidas como NodD (elemento trans, o qual é um fator de transcrição sítio-específico). Essa proteína NodD se liga a seqüências de DNA altamente conservadas de 55 pares de bases (pb) encontradas nas regiões promotoras dos genes de nodulação, denominadas de “caixas *nod*” (PECK et al., 2006), ou elementos *cis*. A ligação dessas proteínas às “caixas *nod*” ocorre tanto na presença, como na ausência de flavonóides, porém, somente a presença do indutor é capaz de converter a proteína NodD em sua forma ativa, desencadeando a expressão dos genes de nodulação (BRENCIC; WINANS, 2005). As proteínas NodD pertencem à família “LysR-type” de ativadores transcricionais e apresentam diferentes especificidades pelos flavonóides e outros compostos derivados, dependendo da espécie em estudo; além disso, estão presentes em todas as estirpes de rizóbio investigadas até o momento, havendo uma variação entre as espécies quanto ao número de cópias presentes (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; MERCANTE et al., 2002; GRANGE, 2005). *R. leguminosarum* bv. *viciae* e bv. *trifolii* apresentam apenas uma cópia do gene *nodD*. *Rhizobium* sp. NGR234, *R. meliloti* (= *Ensifer meliloti*), e *R. tropici* possuem duas a cinco cópias (BROUGHTON et al., 2000). *Bradyrhizobium japonicum*, duas cópias (LOH & STACEY, 2003). O significado dessas cópias múltiplas de *nodD* e a interação entre as mesmas e os flavonóides não está totalmente elucidado; foi sugerido, entre outros, que poderia haver uma correlação com a especificidade a diferentes hospedeiros (HUNGRIA; STACEY, 1997).

Em *E. meliloti*, a proteína NodD localiza-se no citoplasma e migra em direção à membrana citoplasmática quando o flavonóide é adicionado, sustentando a hipótese de que o sítio de interação entre o NodD e o flavonóide está localizado na membrana interna (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995).



**Figura 1** – Genes de nodulação (*nod*) de (a) *R. leguminosarum* bv. *viciae* (plasmídeo pRLIJI) e (b) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (plasmídeo pRtr ABU841). Os genes são representados por setas que apontam a direção da sua transcrição. Os genes *nod* “comuns” estão representados pelas setas pretas e os específicos dos hospedeiros (*hsn*) pelas setas hachuradas (alguns autores, como Long, 1992, e Phillips, 1992, não consideram os genes *nodI* e *nodJ* como “comuns”). As setas brancas representam os genes regulatórios *nodD* e os triângulos indicam a posição das caixas “*nod*” (Dénarié et al., 1992; Schlaman et al., 1992; Spaink, 1992).

**Fonte:** Hungria (1994).

**Tabela 1** – Genes de nodulação cujas principais funções são conhecidas

Gene	Espécie <sup>(1)</sup>	Função, homologia e localização das proteínas produzidas por esses genes
<i>nodA</i> <i>nodB</i> <i>nodC</i>	Todas	Síntese do fator Nod, sendo essenciais para a divisão das células do córtex e encurvamento do pêlo radicular. NodA e NodB estão localizadas no citoplasma e NodC na membrana externa.
<i>nodD</i>	Todas	Regulador da transcrição, necessário para a expressão dos genes <i>nod</i> . São proteínas que se prendem ao DNA, e estão localizadas na membrana citoplasmática.
<i>nodE</i>	Rl, Rt, Rm	Gene Hsn <sup>(2)</sup> . Homologia com sintases de $\beta$ -cetoacil. Provavelmente envolvida na síntese dos ácidos graxos do fator Nod. Localizada na membrana citoplasmática.
<i>nodF</i>	Rl, Rt, Rm	Gene Hsn. Homologia com proteínas carregadoras de grupos acil. Provavelmente envolvida na síntese dos ácidos graxos do fator Nod. Localizada no citoplasma.
<i>nodG</i>	Rm	Gene Hsn. Homologia com proteínas carregadoras do grupo acil. Pode estar envolvida com a síntese do fator Nod.
<i>nodH</i>	Rm	Gene Hsn. Envolvido na sulfatação do fator Nod.
<i>nodI</i>	Rl, Rt, Bj, Bp	Função desconhecida. Apresenta similaridade com as proteínas de transporte e ligação com ATP. Localizada na membrana citoplasmática.
<i>nodJ</i>	Rl, Rt, Bj, Bp	Função desconhecida. Domínios hidrofóbicos. Talvez tenha uma ação conjunta com o <i>nodI</i> . Localizada na membrana citoplasmática.
<i>nodK</i>	Bp	Função desconhecida. Forma um operon com <i>nodABC</i> .
<i>nodL</i>	Rl, Rm, Rt, Bp	Gene Hsn, envolvido com a acetilação do fator Nod. Em Bp é encontrado apenas por hibridização. Localizada na membrana citoplasmática.
<i>nodM</i>	Rl, Rt, Rm, Bp	Gene Hsn. Homologia com sintetase da D-glucosamina. Provavelmente envolvida com a síntese do fator Nod. Em Bp apenas por hibridização.
<i>nodN</i>	Rl, Rt, Rm, Bp	Gene Hsn. Em Bp apenas por hibridização.
<i>nodO</i>	Rl	Homologia com as proteínas de ligação com o cálcio, hemolisina. Parece facilitar a ligação do fator Nod com receptores da planta. É excretada.
<i>nodP</i>	Rm	Gene Hsn. Atividade da sulfúrilase do ATP, envolvida na síntese do fator Nod, através da sulfatação.
<i>nodQ</i>	Rm	Gene Hsn. Atividade da sulfúrilase do ATP, envolvida na síntese do fator Nod, através da sulfatação.
<i>nodR</i>	Rt	Gene Hsn. Função desconhecida.
<i>nodS</i>	Bj, NGR234	Função desconhecida.
<i>nodT</i>	Rl, Rt	Função desconhecida. Homologia com as seqüências de trânsito. Localizada na membrana externa.
<i>nodU</i>	Bj, NGR234	Função desconhecida
<i>nodV</i>	Bj	Gene Hsn. Regulatório. Homologia com família de genes sensores. Localizada na membrana citoplasmática.
<i>nodW</i>	Bj	Gene Hsn. Similaridade com família de genes reguladores de transcrição. Localizada no citoplasma.

**Fonte:** Hungria (1994)

**Tabela 2** – Genes de nodulação cujas principais funções são conhecidas

Gene	Espécie <sup>(1)</sup>	Função, homologia e localização das proteínas produzidas por esses genes
<i>nodX</i>	Rl (Tom)	Nodulação específica do genótipo.
<i>nodY</i>	Bj	Função desconhecida, formando um operon com <i>nodABC</i> . Relatado somente em Bj, mas encontrado em todas as espécies por hibridização.
<i>nodZ</i>	Bj	Gene Hsn, necessário também para o crescimento em condições microaeróbicas.
<i>nolA</i>	Bj	Nodulação específica do genótipo. Proteínas que se prendem ao DNA.
<i>nolC</i>	Rf	Gene específico do genótipo. Apresenta homologia com o gene de choque térmico de <i>E. coli</i> .
<i>nolD</i>	Rm	Gene Hsn.
<i>nolE</i>	Rl, Rm	Gene Hsn (Rm). Função desconhecida (Rl). Localizada no periplasma.
<i>nolF</i> , <i>nolG</i>	Rm	Gene Hsn.
<i>nolP</i>	Rl	Função desconhecida. Pode ser gene Hsn.
<i>nolR</i>	Rm	Repressor da expressão dos genes <i>nod</i> .

(1) Rl: *R. leguminosarum*; Rt: *R. trifolii*; Rm: *R. meliloti*; Bj: *Bradyrhizobium japonicum*; Bp: *B. sp. (Parasponia)*; NGR234, *R. sp. NGR234*; Rf: *R. fredii*.

(2) Hsn, host specific gene.

Fonte: Hungria (1994)

## 1.6 GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DO FATOR NOD

O fator de nodulação (fator Nod) representa a chave para os sinais moleculares envolvidos no início do desenvolvimento nodular e na invasão bacteriana (BROUGHTON et al., 2000). Os fatores Nod são sintetizados e exportados da bactéria pelos produtos dos genes *nod* (BRENCIC; WINANS, 2005).

O gene *nodM*, descrito em *E. meliloti* e em *R. leguminosarum* bv. *viciae*, codifica uma glucosamina-sintetase e apresenta elevada homologia com o gene *glmS* de *Escherichia coli*, com capacidade para codificar a proteína que catalisa a formação da 6-P-glucosamina a partir da 6-P-frutose e da glutamina, representando o processo inicial e essencial para a síntese dos fatores Nod (BAEV et al., 1992). Mutantes *nodLMN* não apresentam o fenótipo Nod<sup>-</sup>, mas apenas algumas alterações, como anormalidades no encurvamento dos pelos radiculares (DJORDJEVIC et al., 1985; DÉBELLÉ et al., 1986). BAEV et al (1992) verificaram que em mutantes *nodM* de *E. meliloti* a produção de fator Nod é severamente reduzida, porém, não existem diferenças na estrutura química dos fatores produzidos pela estirpe selvagem e pelo respectivo mutante. Mutantes *nodM* reduziram em até

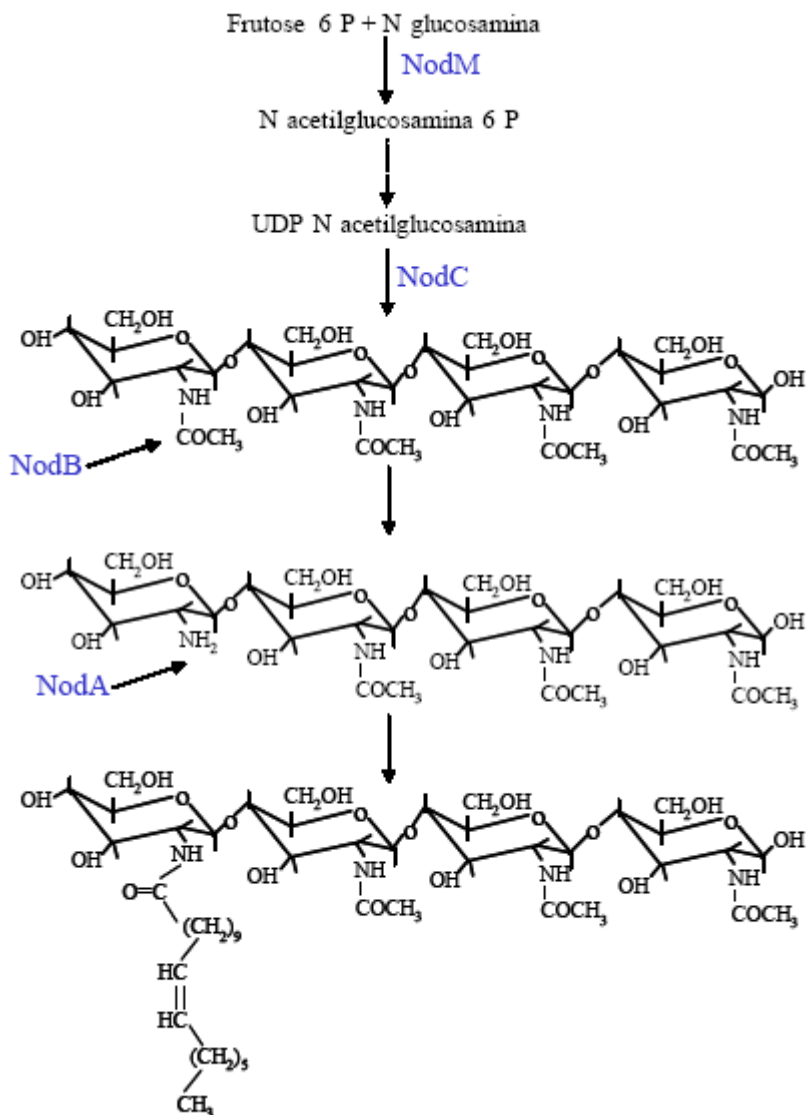
20 vezes a quantidade de fatores Nod em *E. meliloti* e em três vezes em *R. leguminosarum* (LÓPEZ-LARA; GEIGER, 2001). Mutantes *nodM* e *nodN* induziram um atraso significativo na nodulação em *Medicago sativa*, além de diminuição no número de pelos radiculares formados (BAEV et al., 1991). Além disso, os bacteróides derivados da mutação no gene *nodM* em *R. tropici* apresentam um desenvolvimento incompleto e alterações fisiológicas, afetando a fixação do N<sub>2</sub> e o peso seco de plantas de feijoeiro (MANYANI et al., 2001).

As moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) sintetizadas pelas proteínas NodM, ou por outras proteínas homólogas envolvidas no metabolismo natural das bactérias são polimerizadas em tri-, tetra- e pentassacarídeos mediante a atividade da N-acetilglucosamina transferase produzida pela proteína NodC (BARNY; DOWNIE, 1993) (Figura 2). A proteína NodA promove a transferência de um grupo acil ao grupo amina livre da extremidade não redutora, enquanto a proteína NodB age na desacetilação do resíduo de N-acetilglucosamina da extremidade não redutora do fator Nod (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995; BROUGHTON et al., 2000; PINTO, 2007).

Posteriormente, a estrutura básica do fator Nod pode ser modificada, mediante a ação de várias proteínas codificadas pelos genes de nodulação específicos de cada rizóbio, as quais conferem uma variedade de substituições, por exemplo, com fucosil, arabinosil, sulfato, carbamil, acetil ou glicerol (HUNGRIA; STACEY, 1997; RASMUSSEN et al., 2004; GRANGE, 2005; PINTO, 2007), resultando nas diversas estruturas de fatores Nod liberados por diferentes espécies de rizóbios, desempenhando importante função na especificidade hospedeira (BRENCIC; WINANS, 2005; PINTO, 2007). *R. tropici* sintetiza uma combinação de fatores de nodulação sulfatados e não-sulfatados. Ambos estimulam o processo de divisão das células corticais externas de *P. vulgaris*, porém os compostos sulfatados são, em grande parte, mais ativos (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995). Acredita-se que essa habilidade em produzir os dois tipos de compostos representa uma função importante na ampla capacidade de nodular vários hospedeiros que esta espécie de rizóbio possui (POUPOT et al., 1995b). Em concentrações da ordem de picomolares e nanomolares, estas moléculas provocam deformação dos pelos radiculares, rápida despolarização da membrana, expressão de nodulinas iniciais, e mitose no córtex da raiz, os quais, de certa forma, conduzem à organogênese do nódulo (POUPOT et al., 1995a).

O gene *nodG* é um gene *hsn*, sendo responsável pela modificação no esqueleto oligossacarídico do fator Nod (PINTO, 2007). O gene *nodG* foi descrito em quatro rizóbios, *E. meliloti* 1021, que nodula *Medicago sativa* (SWANSON et al., 1987), *Rhizobium* sp. N33 que nodula *Astragalus cicer* e *Onobrychis viciifolia* (CLOUTIER et al., 1997),

*Mesorhizobium* sp. 7653R que nodula *Astragalus sinicus* (ZHANG et al., 2000), e mais recentemente em *R. tropici* PRF 81, que nodula *Phaseolus vulgaris* (PINTO et al., 2009). Este gene está localizado no mesmo operon e imediatamente abaixo de *nodFE* nos três primeiros rizóbios descritos (LÓPEZ-LARA; GEIGER, 2001). LÓPEZ-LARA; GEIGER (2001) verificaram que a proteína NodG possui a mesma função bioquímica que FabG, uma proteína de nodulação com atividade enzimática 3-oxoacyl-ACP redutase (3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase), codificada pelo gene *fabG* de *R. leguminosarum*. Esta enzima catalisa a primeira etapa de alongação da cadeia de ácido graxo. A similaridade elevada da proteína NodG com a 3-oxoacyl-ACP redutase, relatada anteriormente, somada ao fato de que mutações no gene *nodG* de *E. meliloti* não resultarem em qualquer alteração na estrutura de ácido graxo do fator Nod, sugerem a presença de uma duplicação do gene, ou de um equivalente cromossomal que possa substituir a proteína NodG. No entanto, estudos fenotípicos da simbiose de rizóbios carregando uma mutação no gene *nodG*, indicaram que a função dessa proteína, em alguns casos, não pode ser totalmente complementada pelo equivalente cromossomal (LÓPEZ-LARA; GEIGER, 2001). Em alguns casos, mutantes *nodG* de *E. meliloti* inoculados na alfafa não apresentaram qualquer falha na nodulação, enquanto em outros causaram apenas um leve atraso na nodulação (HORVATH et al., 1986; Swanson et al., 1987). Mutantes *nodG* de *Rhizobium* sp. N33 tiveram leve falha na nodulação e formaram um número reduzido de nódulos na planta hospedeira *Astragalus cicer*; além disso, os nódulos formados em *Onobrychis viciifolia* são menores (CLOUTIER et al., 1997). Também, foi mostrado que mutantes de *E. meliloti* RCR2011 deficientes em *nodG* ou *nodE* formaram nódulos menores em *Sesbania macrocarpa* em relação à estirpe parental (KRISHAN; PUEPPKE, 1998).



**Figura 2** – Rota biosintética da estrutura básica de um fator de nodulação.

Fonte: Downie, 1998.

### 1.7 SINAIS MOLECULARES LIBERADOS EM EXSUDATOS DE PLANTAS HOSPEDEIRAS

As estirpes de rizóbios podem sobreviver no solo por vários anos, sem estarem associadas às plantas hospedeiras. O pré-requisito para que o rizóbio esteja associado como um microssimbionte, no entanto, é o de que a planta seja capaz de se comunicar com ele (MERCANTE et al., 2002).

As plantas exsudam elevados níveis de nutrientes, frequentemente mais de 20% de todo o C fixado. Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos aromáticos,

dentre outros metabólitos secundários compreendem a maioria dos exsudatos de baixo peso molecular da raiz, enquanto exsudatos de alto peso molecular incluem, principalmente, polissacarídeos e proteínas (BRENCIC; WINANS, 2005). Tais compostos servem não apenas como fonte de C para o crescimento microbiano, mas também estão envolvidos na quimiotaxia desses microrganismos na rizosfera, além de controlar o fornecimento de N para as leguminosas simbióticas (DAKORA; PHILLIPS, 2002).

A existência de sinais enviados da planta para a bactéria e vice-versa foi deduzida a partir de um experimento realizado por van Brussel et al. (1986), em que plantas de *Vicia sativa* subsp. *nigra* foram cultivadas sob condições estéreis em meio líquido e, após sete dias, foram inoculadas com *R. leguminosarum* bv. *viciae*. O sobrenadante desta cultura foi, então, esterilizado por filtração e utilizado como substrato para *V. sativa*, também em condições estéreis. Após sete dias de crescimento, as raízes mostraram respostas positivas quanto à deformação dos pelos radiculares (fenótipo “Had” – hair deformation) e formação de raízes mais curtas e grossas (fenótipo “Tsr” – thick and short root). Esses fenótipos radiculares foram utilizados para avaliar a resposta do hospedeiro ao microsimbionte específico (CANTER-CREMERS et al., 1986; VAN BRUSSEL et al., 1986; ZAAT et al., 1987a). Os controles que incluíam plantas crescendo em sobrenadantes de bactérias, que não haviam sido expostas aos exsudatos das plantas, e em exsudatos de plantas que não haviam sido inoculadas com bactérias, foram negativos para os fenótipos “Had” e “Tsr”. Foi constatado, ainda, que “Tsr” e “Had” estavam necessariamente ligados à presença do plasmídeo simbiótico (pSym) e dos genes *nodABC* da bactéria (van Brussel et al., 1986). Resultados semelhantes foram obtidos com *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e plantas de *Trifolium repens* (CANTER-CREMERS et al., 1986).

## 1.8 SINAIS INDUTORES DOS GENES DE NODULAÇÃO DO RIZÓBIO

Inicialmente, os estudos dos sinais liberados pelas plantas baseavam-se na indução dos fenótipos Had e Tsr, referentes à deformação dos pelos radiculares e à formação de raízes mais curtas e grossas, respectivamente (VAN BRUSSEL et al., 1986). Posteriormente, estas análises foram substituídas por outra mais específica e direta, baseada na indução dos genes *nod* pelos sinais da planta presentes nos seus exsudatos. Dessa forma, a identificação dos indutores destes genes passou a ser obtida com a construção de “plasmídeos

repórteres”, ou seja, fragmentos de DNA da região *nod* são unidos, por um processo denominado de “fusão de genes”, ao gene estrutural *lacZ* (sem promotor), de *E. coli*. Com estas construções genéticas, a expressão dos genes *nod* pode ser monitorada pela atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (INNES et al., 1985; MULLIGAN; LONG, 1985; ROSSEN et al., 1985; ZAAT et al., 1987b). A expressão dos operons *nod* induzíveis está sob o controle do produto do gene *nodD*, que, na forma ativada por exsudatos liberados pelas plantas, inicia a transcrição destes operons (MULLIGAN; LONG, 1985; INNES et al., 1985; ROSSEN et al., 1985; ZAAT et al., 1987a).

As fusões entre o gene *lacZ* de *E. coli* e os genes *nod* de rizóbio têm sido usadas para monitorar a atividade indutora de vários exsudatos e extratos de plantas, uma vez que a expressão do gene *nod* está diretamente relacionada à produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, que pode ser medida facilmente por métodos colorimétricos (MULLIGAN; LONG, 1985; BOIVIN et al., 1990; LAM et al., 1990). Assim, a expressão dos genes *nod* na presença de um sinal da planta (flavonóide ou outros sinais) induz à produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, por exemplo, desenvolvendo uma coloração azul na presença de “X-gal” (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosida), que é substrato da enzima (DRAHOS et al., 1986).

O primeiro indutor estudado foi isolado de extratos de sementes de alfafa e identificado como um composto fenólico, uma flavona, “luteolina”, derivada do metabolismo dos fenilpropanóides (PETERS et al., 1986). Após a identificação desse flavonóide, outros indutores presentes nas sementes e raízes de outras leguminosas hospedeiras começaram a ser identificados (Tabela 2). A grande maioria dos compostos investigados posteriormente foram identificados como flavonóides, que induziram a transcrição dos genes *nodABC* em estirpes de *E. meliloti* (MAXWELL et al., 1989; HARTWING et al., 1990), *Bradyrhizobium japonicum* (KOSSLAK et al., 1987), *Ensifer fredii* (KAPE et al., 1992), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (FIRMIN et al., 1986; ZAAT et al., 1989), *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (HUNGRIA et al., 1991a, b).

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de metabólitos secundários derivados do metabolismo dos fenilpropanóides, sendo distribuídos por todo o reino vegetal e sintetizados tanto na parte aérea, quanto nas raízes. Modificações específicas na estrutura básica desses indutores produzem diferentes classes de flavonóides incluindo chalconas, flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas (BRENCIC; WINANS, 2005; HUNGRIA et al., 1991b), que são liberados pelas plantas hospedeiras. Contudo, o espectro de flavonóides é dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta (BRENCIC;

WINANS, 2005). Os flavonóides exsudados por sementes e raízes de uma determinada leguminosa consistem de uma mistura de indutores dos genes *nod* fracos e fortes, além de compostos inibidores e ineficazes (MULLIGAN; LONG, 1985; FIRMIN et al., 1986; PETERS et al., 1986; REDMOND et al., 1986; HARTWIG et al., 1989, 1990; HUNGRIA et al., 1992). Além disso, a exsudação radicular não é uniformemente distribuída ao longo do eixo radicular. Os flavonóides são liberados em maior quantidade próximos às extremidades radiculares, e concentrações ótimas ocorrem nas proximidades da zona de emergência dos pelos radiculares, correspondente à região mais susceptível à infecção e nodulação (BRENCIC; WINANS, 2005). Além dos flavonóides, alguns compostos não pertencentes à família dos flavonóides, como estaquidrina (N-metilprolina) e trigonelina (ácido nicotínico N-metilbetaina), foram identificados em exsudatos de sementes de alfafa como indutores dos genes *nod* em *E. meliloti* (PHILLIPS et al., 1992). Essas moléculas são classificadas como compostos quaternários de amônio, sendo coletivamente conhecidas como betaínas. Ambas, trigonelina e estaquidrina, foram encontradas em sementes, raízes e exsudatos de raízes de várias leguminosas, e uma concentração maior que a dos flavonóides é necessária para indução dos genes *nod* (BRENCIC; WINANS, 2005).

No caso do feijoeiro, o principal grupo de compostos indutores liberados pelas sementes foi identificado como antocianidinas (delfinidina, petunidina e malvidina) e flavonóis (miricetina, quercetina e canferol) (HUNGRIA et al., 1991a). Nos exsudatos radiculares foram identificados eriodictiol, naringenina e genisteína como os principais indutores (HUNGRIA et al., 1991b). Bolanós-Vásquez e Werner (1997) identificaram outros compostos flavonóides indutores dos genes *nod* em exsudatos radiculares de feijoeiro, a chalcona isoliquiritigenina, e a correspondente flavanona liquiritigenina.

Os efeitos indutores podem ser aditivos ou sinérgicos, mas os indutores fracos em quantidade modestas podem reduzir o efeito de indutores fortes (HARTWIG et al., 1989). Os indutores potentes podem atuar em concentrações menores que 1 mM (GÖTTTFERT, 1993). Segundo Hartwig et al. (1989), a presença de concentrações sub-ótimas de diferentes indutores pode resultar em um aumento sinérgico na expressão do gene. Os resultados experimentais obtidos por estes autores demonstraram que a leguminosa parece se beneficiar do efeito sinérgico entre indutores da semente e indutores da raiz, criando uma zona altamente propícia à nodulação na coroa da raiz. Do mesmo modo, foi observado um aumento na transcrição dos genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pela ação sinérgica entre a malvidina, principal indutor das sementes de feijão, e a genisteína, indutor mais potente das raízes (HUNGRIA et al., 1992).

Também foi observado que alguns flavonóides podem atuar como repressores da indução do gene *nod* (FIRMIN et al., 1986; DJORDJEVIC et al., 1987; PETERS; LONG, 1988; KOSSLAK et al., 1990). A daidzeína e a genisteína, por exemplo, que são fortes indutores em *B. japonicum*, são potentes inibidores da expressão do gene *nod* em *E. meliloti* (GYÖRGYPAL et al., 1991). Diversos estudos mostram, ainda, que a transcrição dos genes pode ser inibida por uma interação complexa entre os próprios indutores liberados pela planta. Djordjevic et al. (1987), por exemplo, verificaram que um indutor forte poderia ser atenuado por um indutor fraco do mesmo hospedeiro inoculado com *R. leguminosarum* bv. trifolii. Do mesmo modo, a ação do principal indutor (metoxi-chalcona) exsudado pelas raízes de alfafa foi diminuída por dois indutores fracos (hidroxi-flavona e hidroxi-flavanona) liberados pelas raízes do mesmo hospedeiro, inoculado com *E. meliloti* (HARTWIG et al., 1989).

De uma maneira geral, a síntese e a liberação de flavonóides são controladas, principalmente, pela planta. Contudo, as bactérias presentes na rizosfera são capazes de influenciar a síntese e/ou exsudação de flavonóides indutores do gene de nodulação, alterando o metabolismo da planta. Foi demonstrado que *R. leguminosarum* bv. viciae (VAN BRUSSEL et al., 1990), *B. japonicum* (CHO; HARPER, 1991) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (DAKORA et al., 1993), assim como fatores Nod purificados (SPAINK et al., 1991), aumentaram a produção de flavonóides indutores nas plantas hospedeiras. Assim, tem sido sugerido que a exsudação destes indutores em resposta aos fatores Nod poderia representar um terceiro passo da comunicação molecular entre planta e o microrganismo (HUNGRIA, 1994).

Resultados experimentais mostram a possibilidade de se obter incrementos na nodulação, por exemplo, pelo fornecimento suplementar de sinais (flavonóides), que poderiam ser adicionados aos inoculantes. Hungria e Phillips (1993), por exemplo, observaram que entre duas linhagens de feijão (uma parental e uma mutante isogênica para a síntese dos principais indutores dos genes *nod*), a nodulação da mutante isogênica estava limitada pelo baixo teor de indutores, recuperando a nodulação quando os flavonóides foram adicionados às sementes. Em outro estudo, foi constatado que a adição de flavonóides indutores às raízes de alfafa inoculada aumentou a nodulação, mostrando que, naquelas condições, os flavonóides eram os fatores limitantes (KAPULNIK et al., 1987).

Enfim, diversos benefícios agrônômicos, como o aumento significativo da nodulação de leguminosas e da capacidade competitiva das estirpes de rizóbio, podem ser alcançados pelo aumento quantitativo e/ou qualitativo dos indutores exsudados pelo

hospedeiro. Contudo, torna-se necessário um melhor entendimento da troca de sinais nas interações planta-microrganismos para otimizar a aplicação desse conhecimento; além de identificar as melhores substâncias que podem ser utilizadas como indutoras para cada tipo de rizóbio.

**Tabela 3** – Indutores dos genes *nod* isolados de leguminosas.

<b>Leguminosa</b>	<b>Flavonóide</b>
Alfafa ( <i>Medicago sativa</i> )	4,4'-di-hidroxi-2'-metoxichalcona 4'-7-di-hidroxi-flavona liquiritigenina
Caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )	daidzeína genisteína coumestrol
Feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	genisteína genisteína-3'-O-glucosídeo eriodictiol naringenina daidzeína coumestrol antocianina
<i>Macrotilona</i> ( <i>Macrotyloma geocarpum</i> L.)	daidzeína genisteína coumestrol
Soja ( <i>Glycine max</i> )	isoliquiritigenina genisteína genisteína-7-O-glucosídeo genisteína-7-O-(6"-O-malonilglucosídeo) daidzeína daidzeína-7-O-(6"-O-malonilglucosídeo)
Ervilhaca ( <i>Vicia sativa</i> )	3,5,7,3'-tetra-hidroxi-4'-metoxiflavanona 7,3'-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona 2',4',4-tri-hidroxi-chalcona 4',4-di-hidroxi-2'-metoxichalcona naringenina liquiritigenina 7,4'-di-hidroxi-3'-metoxiflavanona 5,7,4'-tri-hidroxi-3'-metoxiflavanona 5,7,3'-tri-hidroxi-4'-metoxiflavanona
Trevo branco ( <i>Trifolium repens</i> L.)	7,4'-di-hidroxi-flavona umbelliferona <sup>a</sup> formononetina <sup>a</sup>
Amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	daidzeína genisteína coumestrol
Sesbânia ( <i>Sesbania rostrata</i> )	liquiritigenina
Lupinus ( <i>Lupinus albus</i> )	ácido eritrônico ácido tetrônico

<sup>a</sup> inibidores dos genes *nod*

**Fonte:** Hungria e Stacey (1997); Dakora e Phillips (2002).

## 1.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Durante as décadas de 80 e 90, foi investido muito tempo e esforço no sequenciamento do genoma de diversos organismos, com o intuito de se elucidar completamente o mecanismo de funcionamento celular a nível molecular (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Esta rápida e crescente disponibilização de dados genômicos despertou grande interesse científico, porém, o conhecimento acumulado com os sequenciamentos de genomas de diferentes organismos demonstra que é preciso caminhar mais adiante. Na era pós-genômica ou era pós-sequenciamento, ficou evidente que o conhecimento das sequências completas de todos os genes de um organismo não é suficiente para se elucidar todos os mecanismos moleculares de uma célula. Os projetos genoma envolvem o sequenciamento dos conjuntos de genes de um organismo inteiro ou de parte dele, não revelando, porém, dados sobre a expressão destes genes, a quantidade expressa e o funcionamento dos seus produtos. O fato de as células de um organismo terem o mesmo genoma, mas apresentarem as mais variadas funções e morfologias, resultado de diferentes composições de proteínas expressas, ilustra a importância de estudar não só a sequência dos genes, mas também a sua expressão para podermos compreender as suas funções biológicas. Para este tipo de estudo foram desenvolvidas as abordagens de avaliação do genoma funcional, como a transcriptômica e a proteômica.

A transcriptômica se baseia no estudo da expressão dos genes. Transcriptoma é o termo dado ao conjunto de RNAs mensageiros (RNAm) que codificam as informações que a célula precisa em um determinado momento (NAKANISHI; NUREKI, 2005). Neste caso, podem-se obter informações precisas sobre a regulação da transcrição. Porém, devido a mecanismos de regulação pós-traducionais, a quantidade de proteína expressa não é necessariamente proporcional à quantidade de seu RNAm correspondente (CALSA JUNIOR et al., 2004).

Já a proteômica é definida como a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas por um organismo ou tecido em um determinado momento e sob uma condição específica (JAMES, 1997; ROCHA et al., 2005; WILKINS et al., 1997).

Técnicas para análise diferencial da expressão de genes utilizam como alvo de estudo, principalmente os transcritos (moléculas de RNAm), que são sintetizados pelo indivíduo durante determinado tratamento, em comparação com aqueles produzidos na ausência do mesmo (PEREIRA, 2008).

Apesar de analisar a expressão de centenas de genes simultaneamente, técnicas de análise da expressão gênica em larga escala como os microarranjos de DNA, apresentam baixa sensibilidade comparativa. Atualmente a técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (RT-qPCR) apresenta-se como a metodologia mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene, oferecendo ainda dados rápidos e reprodutíveis (GINZINGER, 2002). Em contraste com quantificações nos ciclos finais da PCR (end points), a PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Desse modo, é possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo, e durante a fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial.

Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar ou *threshold* e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. Este valor é a base para a quantificação baseada em PCR quantitativo (MARCELINO, 2006).

A maioria dos estudos de expressão dos genes *nod* reportados na literatura, os quais baseiam-se na indução desses genes pelos sinais da planta presentes nos seus exsudatos, são obtidos através das construções de “plasmídeos repórteres”. Essas construções genéticas permitem monitorar a expressão dos genes *nod* através da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (INNES et al., 1985; MULLIGAN; LONG, 1985; ROSSEN et al., 1985; ZAAT et al., 1987b).

Várias técnicas desenvolvidas nos últimos anos, na área de biologia molecular, têm permitido a análise da expressão gênica de vários organismos em nível global e/ou pontual, contudo, existem poucos estudos utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para verificar a expressão de genes de nodulação (*nod*) em rizóbios. Wei et al. (2008) verificaram o perfil de expressão global de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 em resposta a exsudatos de sementes de soja (*Glycine max*) e genisteína, através de macroarranjos de DNA. Posteriormente, doze genes diferencialmente expressos foram, de

fato, validados por RT-qPCR. Estes estudos podem fornecer informações valiosas para a compreensão dos mecanismos envolvidos na simbiose entre o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e seu microssimbionte *Rhizobium tropici*.

## 2 OBJETIVO

Verificar a expressão, por RT- qPCR, dos genes de nodulação *nodC* e *nodG* de *Rhizobium tropici*, estirpe PRF 81, após a indução por flavonóide naringenina (4',5,7-trihydroxyflavanone) e por exsudato de sementes de feijão.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ESTIRPE BACTERIANA

Foi utilizada a estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *R. tropici*, microssimbionte do feijoeiro. A estirpe consta do banco de germoplasma de rizóbios da Embrapa Soja (Londrina, Paraná, Brasil), onde vem sendo estudada há vários anos. A estirpe é utilizada em inoculantes comerciais e não oferece risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

### 3.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A estirpe foi retirada do estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$ , repicada em meio de cultura YM sólido (VINCENT, 1970), com corante vermelho congo (0,025%), e crescida a  $28^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Após, a estirpe foi inoculada em 10 mL de meio de cultura TY líquido (BERINGER, 1974), e a cultura (pré-inóculo) foi mantida sob agitação a  $28^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 24 horas, até atingir a densidade óptica de 0,9 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi

adicionado em 200 mL de meio de cultura TY líquido, onde foi aplicado os diferentes tratamentos de indução dos genes de nodulação (*nod*).

### 3.2.1 Indução dos Genes de Nodulação (*Nod*)

#### 3.2.2 Experimento 1:

O experimento seguiu um delineamento em blocos ao acaso com três réplicas como blocos, sendo testados dois tipos de indutores dos genes de nodulação (*nod*): o flavonóide naringenina (4',5,7-trihydroxyflavanone, Sigma) na concentração final de 1,5  $\mu$ M, e exsudato de sementes de feijão, preparado conforme descrito por Hungria et al., (1991b), também na concentração final de 1,5  $\mu$ M dos flavonóides presentes, preparado conforme descrito no item 3.3. Cada tratamento foi comparado com seu respectivo controle, metanol ou água, que foram utilizados como calibradores nas análises de expressão gênica.

Neste experimento, a naringenina ou metanol e exsudato ou água foram adicionados simultaneamente ao pré-inoculo no meio de cultura, permanecendo por 48 h sob agitação, a 28°C. A seguir, procedeu-se à extração de RNA. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 3.2.3 Experimento 2:

O experimento seguiu um delineamento em blocos ao acaso com três réplicas como blocos, em uma estrutura fatorial, com dois fatores: tipo de indutor dos genes *nod* [o flavonóide naringenina (4',5,7-trihydroxyflavanone, Sigma) ou exsudato de sementes de feijão, preparado conforme descrito por Hungria et al. (1991b), ambos na concentração final de 1,5  $\mu$ M], e tempos de indução [T<sub>5</sub> (5 min), T<sub>15</sub> (15 min), T<sub>1</sub> (1 h), T<sub>4</sub> (4 h) e T<sub>8</sub> (8 h)].

Neste experimento, o processo de indução dos genes de nodulação (*nod*) ocorreu após as células bacterianas atingirem a fase exponencial de crescimento (após

atingirem uma OD<sub>600</sub> de 0,4 – 0,6). Em seguida, procedeu-se a extração de RNA. Cada tratamento foi comparado com seu respectivo controle, metanol ou água, que foram utilizados como calibradores nas análises de expressão gênica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com exceção para os tratamentos de 15 min e 1 h de indução, os quais foram conduzidos apenas uma repetição biológica, e em duplicata na placa.

### 3.3 PREPARO DO FLAVONÓIDE E DO EXSUDATO DE SEMENTES DE FEIJÃO

Foi preparado uma solução estoque de naringenina à 1000 µM (em metanol), sendo utilizado um volume de 300 µL desse estoque nos ensaios acima citados (para 200 mL de meio de cultura TY líquido), logo a concentração final de 1,5 µM. O mesmo volume de metanol foi utilizado no meio como controle para o tratamento com naringenina.

O exsudato de sementes de feijão foi preparado conforme descrito por Hungria et al. (1991b). A concentração do flavonóide foi determinada espectrofotometricamente, no comprimento de onda 289 nm e usando o coeficiente de extinção molar ( $\log \epsilon$ ) 4.23 (HUNGRIA et al., (1991b). Um volume de 160 µL de exsudato de sementes de feijão foi, então, utilizado nos ensaios acima citados (para 200 mL de meio de cultura TY líquido), logo a concentração final de 1,5 µM. O mesmo volume de água foi utilizado no meio como controle para o tratamento com exsudato.

### 3.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total das bactérias foi extraído pelo método descrito por Farrel (1998), com algumas modificações. Após o período de crescimento, procedeu-se à centrifugação das culturas a 10,000 g por 10 min e a 4°C e à ressuspensão do precipitado celular em 3 mL de tampão de lise NP-40 (solução de sacarose 250 mM; 20 mM EDTA; 0,75% de NP-40 Nonidet P40, detergente não-iônico) e 4 mL de tampão de acetato de potássio ( 3 M KCH<sub>3</sub>O<sub>2</sub> pH 5,5; 10 g de tiocianato de guanidina). A suspensão celular foi, então, incubada no gelo por 10 min e após esse período, centrifugada a 10,000 g por 10 min a

4°C. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo estéril, com o cuidado de não transferir nenhum precipitado sólido, e incubado no gelo por 15 min, sendo centrifugado novamente, em seguida, a 10,000 g por 10 min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e a este foi adicionado um volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo homogeneizado gentilmente. A seguir, a mistura foi, então, centrifugada por 3 min a 10,000 g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 0,6 do volume de isopropanol gelado. Após gentil homogeneização, a mistura foi incubada a -20°C por 1 hora. Após esse período, o RNA foi coletado por centrifugação a 10,000 g por 10 min a 4°C. O isopropanol foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado duas vezes com etanol 70%, seguido por centrifugação a 10,000 g por 5 min a 4°C. O etanol 70% foi, então, removido e o RNA, seco em estufa a 37°C. O RNA foi ressuspense em 200 µL de água livre de RNase tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e estocado a -80°C.

O RNA extraído foi quantificado usando micro-espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, Unisciense), com leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando água DEPC como controle (branco). O DNA foi removido com a DNase [RNase free DNase Set (50), Qiagen], conforme as recomendações do fabricante, no qual 2 U de DNase foram utilizadas para cada 1000 ng de RNA. A reação foi incubada a 37°C por 10 min, sendo interrompida por choque térmico a 60°C por 5 min. O RNA foi quantificado novamente, sendo utilizado, para a síntese da primeira fita de cDNA, aquele com relação à 260/280 entre 1,9 - 2,0, o que garante, juntamente com o perfil do gráfico, RNA íntegro e de boa qualidade.

Para cada reação de síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado 1,0 µg de RNA utilizando o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante (Sybr®Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol, Applied Biosystems). A cada reação foram, então, adicionados: 10 µL de TaqMan RT Buffer 10x; 22 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 20 µL de dNTP's (2,5 mM); 5 µL de *primer* randômico (50 µM); 2 µL de inibidor da RNase (20 U/L); 2,5 µL de enzima transcriptase reversa (50 U/µL) e água livre de RNase suficiente para um volume final de 100 µL de reação. As reações foram incubadas em termociclador por 10 min a 25°C, seguidos por 30 min a 48°C e 5 min a 95°C. O cDNA foi armazenado a -80°C.

### 3.5 DESENHO DOS PRIMERS PARA RT-QPCR

Os *primers* para amplificação dos genes foram desenhados com base no genoma parcial de *R. tropici* PRF 81 (PINTO et al., 2009), utilizando o software Primer Express versão 3.0 (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA). Foram obtidos *amplicons* de tamanhos entre 50 e 150 pares de bases para os genes alvos *nodC* e *nodG*, e o gene que codifica para a sub-unidade 16S, que foi utilizado como normalizador. As sequências dos pares de *primers* desenhados para cada gene são mostradas na Tabela 3.

**Tabela 4** – Sequências dos *primers* utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Amplicon
<i>nodC</i>	F 5' CAAGCTGCGCCCTTATCTG 3'	68 bp
	R 5' CAAGCAACGTGTCACGGAAA 3'	
<i>nodG</i>	F 5' GAGCTGACCCATCCGATGA 3'	64 bp
	R 5' CGACGACCGAGGTGATGTT 3'	
16S	F 5' CAAGGCGACGATCCATAGCT 3'	72 bp
	R 5' AGGAGTTTGGGCCGTGTCT 3'	

### 3.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit *SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA).

Curvas de eficiência de amplificação para cada par de *primers* dos genes estudados e para o par de *primers* do gene normalizador foram realizadas a partir de uma série de diluições do cDNA (de 10 a 10<sup>-10</sup>), sendo testadas diferentes concentrações de *primers*. Os valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos em cada diluição foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema, de acordo com a fórmula  $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$ . Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 62°C por 1 min, sendo os dados coletados neste último passo.

A concentração de *primer* com melhor desempenho na curva de eficiência foi escolhida para ser utilizada na etapa de quantificação relativa. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas, constituindo-se de 12,5  $\mu\text{L}$  de *SYBR Green PCR Master Mix 2x* (AmpliTaqGold<sup>®</sup> DNA polimerase; dNTPs com dUTP; referência passiva ROX; fluoróforo Syber Green); 2,0  $\mu\text{L}$  de cDNA; 1,0  $\mu\text{L}$  ( 0,4  $\mu\text{M}$ ) de cada *primer* F e R para o gene normalizador 16S; 0,8  $\mu\text{L}$  (0,32  $\mu\text{M}$ ) de cada *primer* F e R para os genes alvo *nodC* e *nodG*, sendo completado com água livre de RNase para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2 min; 95°C por 10 min; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 2 min, 62°C por 1 min, sendo os dados coletados na última etapa. Após o término da quantificação relativa, a fim de verificar a formação de dímeros de primers, amplificações inespecíficas e contaminações, realizou-se a curva de dissociação.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O nível de expressão gênica diferencial (RQ) foi calculado aplicando-se o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores médios de Ct dos genes alvos e da referência endógena (normalizador) foram calculados. Posteriormente, através da subtração do Ct do gene alvo com o Ct do normalizador foi obtido o  $\Delta\text{Ct}$ . Este valor de  $\Delta\text{Ct}$  do gene alvo é subtraído do valor de  $\Delta\text{Ct}$  da amostra controle (calibrador – controle não tratado), resultando num valor de ((Ct. O valor de RQ foi determinado pela fórmula  $1,95^{-((\Delta\text{Ct}) - \Delta\text{Ct}_{\text{controle}})}$ , ajustada pelas eficiências obtidas entre o gene alvo e normalizador.

A partir dos valores de RQ obtidos em cada corrida foram calculados os valores de RQ geral, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %).

Cada amostra biológica (3 repetições biológicas) foi quantificada em triplicata dentro da placa, totalizando 9 pontos de coleta de dados para cada gene e tratamento em estudo, exceto para os tempos de 15 min e 1h, para os quais foi obtida apenas uma amostra biológica.

A análise dos dados foi feita por estatística descritiva. A reprodutibilidade e precisão dos valores de RQ obtidos foram estimados pelos desvios padrão (SD) e coeficiente de variação (CV %) em cada corrida e entre as corridas. Também foi utilizado o programa REST 2008 (Relative Expression Software Tool), versão 2.0.7 (Pfaffl et al., 2002; <http://www.gene-quantification.info>), o qual compara dois grupos, com até 16 dados (valores)

de Ct por grupo (gene alvo, versus o grupo controle) normalizados pelo gene referência. O programa testa as diferenças para significância através de um teste de randomização (no mínimo 2000 randomizações), baseado em iterações. São apresentados se os genes, em comparação com os respectivos controles, são super (UP) ou “pouco” (DOWN) expressos (regulados), quando a diferença entre os níveis de expressão entre o tratamento e o controle é significativa. A hipótese H<sub>0</sub> corresponde a todos os possíveis contrastantes entre médias serem estatisticamente nulos, ao nível de 5% de probabilidade.

O objetivo do REST, portanto, é determinar se existe diferença significativa entre amostras e controles, normalizados pelo gene referência. P(H<sub>1</sub>) representa a probabilidade da hipótese que a diferença entre a amostra e o controle seja devido ao acaso.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES NODC E NODG EM RHIZOBIUM TROPICI PRF 81 DURANTE A INDUÇÃO POR NARINGENINA E EXSUDATO DE SEMENTES DE FEIJÃO

A expressão dos genes nodC e nodG de *R. tropici* PRF 81, induzidos com exsudatos de sementes de feijão e naringenina, foi monitorada em diferentes tempos de indução; após 48 h de crescimento desde a adição do pré-inóculo e flavonóides ao meio de cultura, bem como à partir da fase log nos tempos de 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h de indução.

Os resultados médios de quantificação relativa (RQ) dos genes nodC e nodG, tratados com exsudato de sementes de feijão e naringenina, em todos os tempos de tratamento de indução, podem ser visualizados nas tabelas 4 e 5.

Os desvios dos valores de (Ct, dentro de cada corrida, não superaram 2,9, demonstrando alta precisão da quantificação. Entre as diferentes corridas os maiores valores de SD e CV (%) foram observados nos tratamentos onde foram obtidos os menores valores de RQ. Os menores valores de RQ são determinados em função de valores de Cts obtidos em ciclos finais da reação, de modo que tal variação é esperada.

Os maiores níveis de expressão gênica foram observados nos tempos de 5 min de indução com o tratamento exsudato de sementes de feijão, para ambos os genes avaliados.

**Tabela 5** – Estatística descritiva baseada nos níveis de expressão dos genes *nodC* e *nodG* tratados com exsudato de sementes de feijão em todos os tempos de indução. Cada amostra foi amplificada em triplicata à partir de 3 repetições biológicas independentes.

Gene / Tratamento	Tempo Indução	Repetição Biológica	delta Ct <sup>1</sup>	SD delta Ct <sup>2</sup>	RQ <sup>3</sup>	RQ Geral <sup>4</sup>	SD Geral <sup>5</sup>	CV (%) <sup>6</sup>
<i>nodC</i> / exsudato	5 min	1	10,744	0,537	159,8615596	121,97	53,59	43,94
		2 *	13,168	0,357	13,6117899			
		3	12,069	0,093	84,0770193			
	15 min	1	21,246	1,998	0,246074876	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	1 hora	1	18,743	0,509	0,687525513	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	4 horas	1	23,402	1,399	1,41035319	1,60	0,27	16,77
		2	24,495	0,384	1,78983002			
		3 *	23,723	0,921	4,50011208			
	8 horas	1	23,661	1,609	0,34842064	0,31	0,06	18,55
		2	-	-	dados perdidos			
		3	25,277	2,702	0,267616778			
	48 horas	1	17,606	0,443	1,89876668	1,88	0,30	16,04
		2	17,653	0,374	1,71172280			
		3	17,601	0,185	1,61247159			
		4 **	7,177	0,272	2,29529924			
	<i>nodG</i> / exsudato	5 min	1 *	8,346	0,603	49,30130460	14,86	2,16
2			11,428	0,487	13,33261599			
3			10,439	0,253	16,38066473			
15 min		1	18,117	0,118	0,360660679	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
1 hora		1	16,994	0,147	1,150849447	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
4 horas		1	18,280	0,164	0,28793819	0,53	0,33	61,74
		2	18,029	0,338	0,40158970			
		3	19,966	0,073	0,90435814			
8 horas		1	16,962	0,103	1,20832357	1,09	0,17	15,31
		2	19,676	0,540	1,16336896			
		3	10,529	0,264	0,89933814			
48 horas		1	14,942	0,219	1,43131610	1,40	0,20	14,19
		2	17,304	0,156	1,58963709			
		3	19,254	0,136	1,19363803			

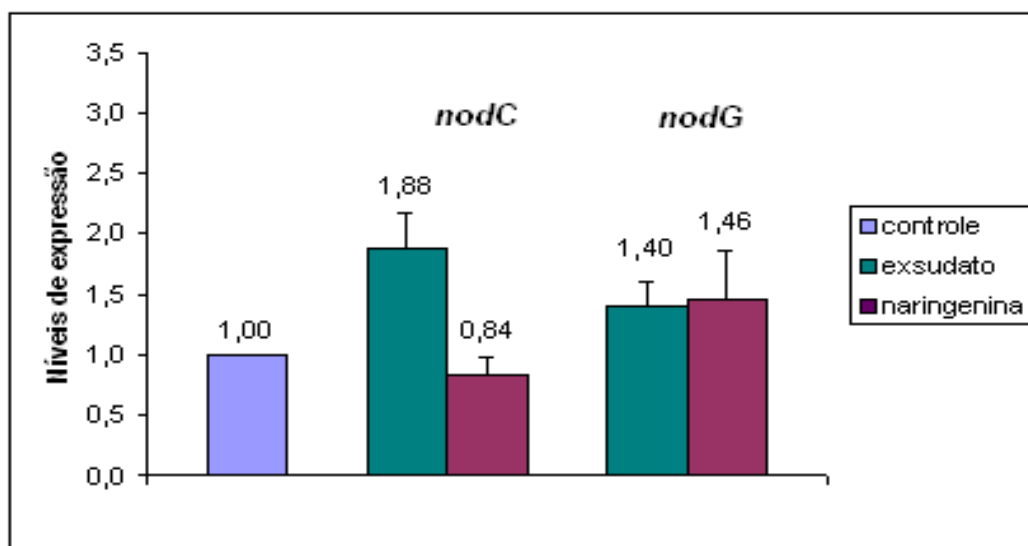
<sup>1</sup> delta Ct, Ct do gene alvo subtraído do Ct do normalizador; <sup>2</sup> SD delta Ct, desvio padrão dos valores de delta Ct; <sup>3</sup> RQ, quantificação relativa; <sup>4</sup> RQ Geral, média da quantificação relativa das repetições biológicas; <sup>5</sup> SD Geral, desvio padrão dos RQs entre as repetições e <sup>6</sup> CV (%), coeficiente de variação. \* Amostras excluídas de modo a diminuir os SD e CV (%). \*\* Repetição em placa. - dados não avaliados.

**Tabela 6** – Estatística descritiva baseada nos níveis de expressão dos genes *nodC* e *nodG* tratados com naringenina (1,5 µM) em todos os tempos de indução. Cada amostra foi amplificada em triplicata à partir de 3 repetições biológicas independentes.

Gene / Tratamento	Tempo Indução	Repetição Biológica	delta Ct <sup>1</sup>	SD delta Ct <sup>2</sup>	RQ <sup>3</sup>	RQ Geral <sup>4</sup>	SD Geral <sup>5</sup>	CV (%) <sup>6</sup>
<i>nodC</i> / naringenina	5 min	1	15,580	0,061	0,59661291	0,48	0,11	23,27
		2	17,142	0,426	0,37347262			
		3	17,948	0,053	0,47169908			
	15 min	1	20,984	0,305	0,96107557	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	1 hora	1	20,728	1,563	0,20551806	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	4 horas	1	11,504	0,890	0,25506424	0,29	0,04	15,46
		2	27,614	0,149	0,27378295			
		3	25,774	2,531	0,34028428			
	8 horas	1	22,345	1,337	1,76448392	1,89	0,26	13,53
		2	24,962	2,905	2,18842105			
		3	10,519	0,294	1,72709757			
	48 horas	1	18,092	1,142	1,04017531	0,84	0,15	17,68
2		16,829	0,154	0,68894867				
3		16,581	0,164	0,79000999				
4 **		6,954	0,048	0,82483165				
<i>nodG</i> / naringenina	5 min	1	12,758	0,121	0,54777955	1,64	0,47	28,64
		2	7,910	0,192	1,31163739			
		3	15,791	0,239	1,97783376			
	15 min	1	18,184	0,381	1,24976588	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	1 hora	1	17,532	0,323	0,45315102	-	-	-
		2	-	-	-			
		3	-	-	-			
	4 horas	1	16,381	0,201	0,77106156	0,81	0,40	49,81
		2	19,273	0,236	0,50074440			
		3	19,458	0,156	1,38786558			
		4 **	9,413	0,091	0,57451919			
	8 horas	1	16,782	0,159	0,85914989	1,56	0,86	55,20
		2	18,389	0,193	2,81292656			
		3	19,944	0,125	1,16933982			
4 **		9,305	0,162	1,41324098				
48 horas	1	15,284	0,137	1,75081039	1,46	0,47	32,49	
	2	17,311	0,186	0,85430444				
	3	18,395	0,069	1,56362659				
	4 **	8,797	0,329	1,65281757				

<sup>1</sup> delta Ct, Ct do gene alvo subtraído do Ct do normalizador; <sup>2</sup> SD delta Ct, desvio padrão dos valores de delta Ct; <sup>3</sup> RQ, quantificação relativa; <sup>4</sup> RQ Geral, média da quantificação relativa das repetições biológicas; <sup>5</sup> SD Geral, desvio padrão dos RQs entre as repetições e <sup>6</sup> CV (%), coeficiente de variação. \*\* Repetição em placa. - dados não avaliados.

De acordo com os resultados, os genes *nodC* e *nodG*, induzidos durante 48 h na presença de exsudato de sementes de feijão apresentaram níveis de expressão gênica superiores ao controle, água (Figura 3), porém, de acordo com os resultados do programa REST, não houve expressão gênica diferencial desses genes, neste tratamento, comparados com o respectivo controle ( $p>0,05$ ) (Tabela 6). Quando submetidos ao tratamento com naringenina, apenas o gene *nodG* apresentou nível de expressão gênica superior ao controle, metanol (Figura 3). Do mesmo modo, após análise REST, nenhum nível de expressão gênica diferencial foi detectado para esse gene, neste tratamento, em relação ao controle metanol ( $p>0,05$ ) (Tabela 6).



**Figura 3** – Níveis de expressão dos genes *nodC* e *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetidos ao tratamento de indução com naringenina e exsudato de sementes de feijão durante 48 h de indução, comparados com os respectivos controles (metanol e água; utilizados como calibradores na RT-qPCR). Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão.

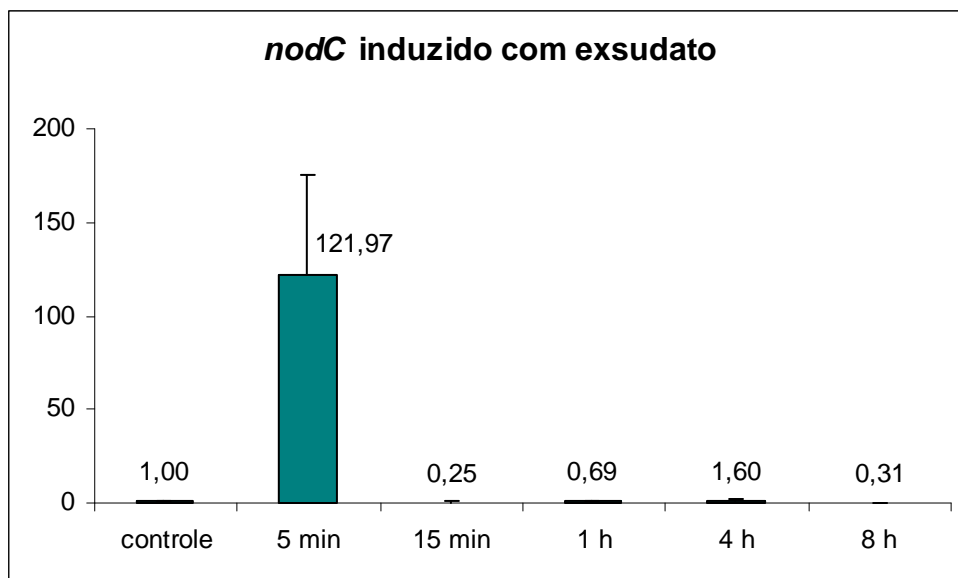
De acordo com a análise estatística, foi possível constatar expressão gênica diferencial do gene *nodC*, quando tratado com exsudato de sementes de feijão, apenas no tempo de 5 min. Pela análise REST verificou-se que o gene *nodC* foi super (UP) expresso 130,122 vezes na presença do exsudato em comparação com o controle água ( $p=0,001$ ). O gene *nodG* apresentou um perfil de expressão similar ao *nodC* na presença do exsudato, sendo diferencialmente expresso após 5 min de indução, pela análise REST. Em 5 min de indução, o gene *nodG* atingiu níveis de expressão 16,785 vezes superior ao controle ( $p=0,001$ ) (Tabela 6). Após 5 min foi possível observar uma queda brusca nos níveis de expressão de ambos os

genes, *nodC* e *nodG*, sendo que o tempo avaliado imediatamente após o pico de indução foi onde se observaram os menores níveis de expressão desses genes para o tratamento com exsudato. Contudo, após essa queda os níveis de expressão do gene *nodC* permaneceram similares ao controle (não diferencialmente expresso) em todos os demais tempos avaliados. Já o gene *nodG* voltou a apresentar um aumento no nível de expressão após 1 h de indução, retornando, após esse tempo, a níveis similares ao controle (Figuras 4 e 5). Após 1 h de indução, o gene *nodG* atingiu um nível de 1,156 vezes superior ao controle ( $p=0,000$ ) (Tabela 6).

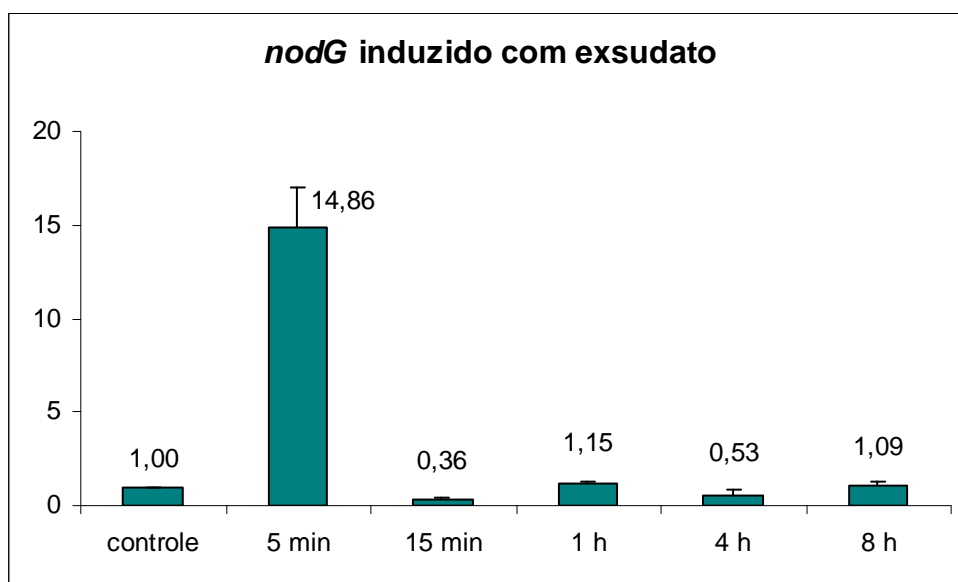
Quando tratado com naringenina, o gene *nodC* apresentou expressão gênica superior ao controle (metanol) apenas no tratamento de 8 h de indução (Figura 6), contudo, de acordo com os resultados do REST, não houve expressão gênica diferencial do gene *nodC* em relação ao controle neste tratamento e tempo (Tabela 6).

Já o gene *nodG*, quando tratado com naringenina apresentou expressão gênica superior ao controle nos tempos de 5 min, 15 min e 8 h (Figura 7), embora, também de acordo com os resultados do REST, o gene *nodG* também não apresentou expressão gênica diferencial em relação ao controle neste tratamento, em nenhum dos tempos de indução (Tabela 6).

Em ambos os genes foi detectado, pela análise estatística, diferença significativa de inibição da expressão (DOWN) nos tempos de 15 min para o *nodG* tratado com exsudato e, 5 min e 1 h para o *nodC* tratado com naringenina (Tabela 6).]



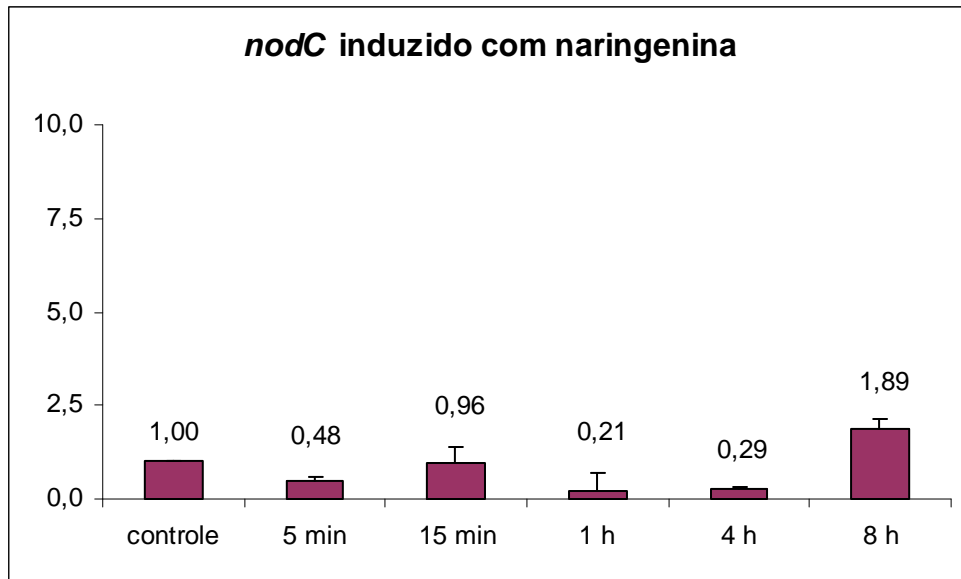
**Figura 4** – Níveis de expressão do gene *nodC*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h, comparados com o controle, água, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão.



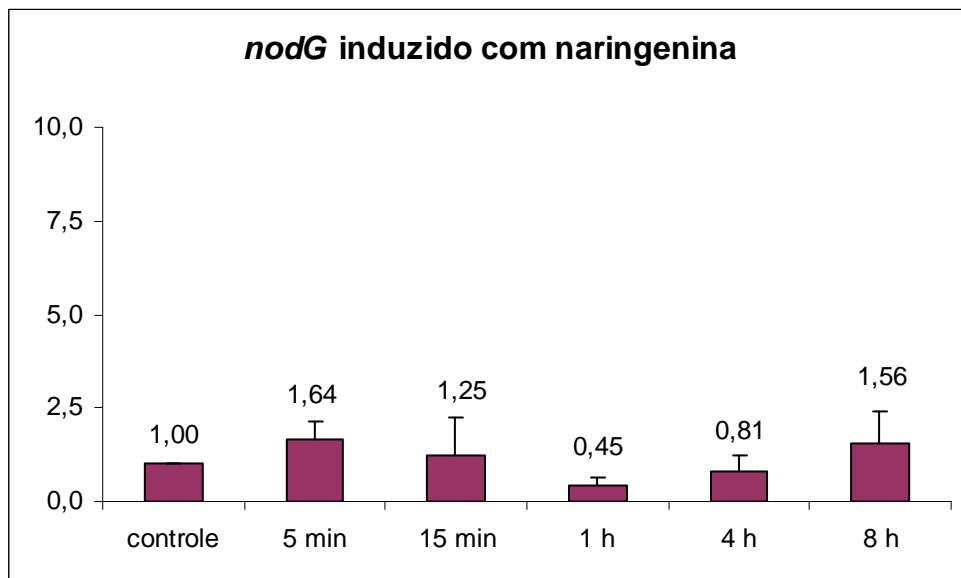
**Figura 5** – Níveis de expressão do gene *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8 h, comparados com o controle, água, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão.

**Tabela 7** – Análise estatística dos resultados de expressão relativa, pelo programa REST 2008 (versão 2.0.7), dos genes *nodC* e *nodG* submetidos ao tratamento com exsudato de sementes de feijão e naringenina, em todos os tempos de tratamento, normalizados pelo gene referência rRNA 16S.

Tratamento	Gene	Tempo	Eficiência da reação	Expressão	Erro padrão	I.C 95%	P(H1)	Resultado
Exsudato	<i>16S</i>		1,0	1,000				
		5 min	0,95	130,122	72,024 - 238,501	62,416 - 543,404	0,001	UP
	<i>nodC</i>	15 min	0,95	0,237	0,062 - 0,945	0,052 - 1,096	0,494	
		1 h	0,95	0,689	0,526 - 0,966	0,417 - 1,163	0,352	
		4 h	0,95	1,535	0,428 - 4,893	0,176 - 13,893	0,429	
		8 h	0,95	0,305	0,049 - 1,536	0,011 - 3,914	0,146	
		48 h	0,95	1,836	0,537-8,634	0,001-3.392,584	0,589	
		<i>nodG</i>	5 min	0,95	16,785	8,179 - 29,436	6,383 - 42,084	0,001
	15 min		0,95	0,350	0,318 - 0,387	0,301 - 0,407	0,000	DOWN
	1 h		0,95	1,156	1,068 - 1,251	1,062 - 1,258	0,000	UP
	4 h		0,95	0,462	0,109 - 2,821	0,076 - 3,869	0,118	
	8 h		0,95	1,102	0,011 - 99,274	0,001 - 705,894	0,887	
	48 h		0,95	1,397	0,253 - 8,104	0,065 - 28,519	0,561	
	Naringenina	<i>16S</i>		1,0	1,000			
5 min			0,95	0,454	0,139 - 1,273	0,056 - 2,560	0,044	DOWN
<i>nodC</i>		15 min	0,95	0,962	0,770 - 1,213	0,707 - 1,312	0,834	
		1 h	0,95	0,204	0,071 - 0,611	0,060 - 0,700	0,000	DOWN
		4 h	0,95	0,288	0,000-2.224,787	0,000-25.679,304	0,619	
		8 h	0,95	1,900	0,001-3.040,340	0,000-123.731,160	0,745	
		48 h	0,95	0,829	0,126 - 7,949	0,000 - 1.478,306	0,802	
		<i>nodG</i>	5 min	0,95	1,120	0,043 - 23,345	0,006 - 663,596	0,899
15 min			0,95	1,248	0,923 - 1,769	0,760 - 2,076	0,344	
1 h			0,95	0,451	0,383 - 0,538	0,348 - 0,586	0,317	
4 h			0,95	0,752	0,062-14,908	0,001-1.448,987	0,799	
8 h			0,95	1,429	0,077 - 13,686	0,001 - 1.867,791	0,735	
48 h			0,95	1,386	0,176 - 13,883	0,002 - 984,681	0,716	



**Figura 6** – Níveis de expressão do gene *nodC*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com naringenina (1,5  $\mu$ M) nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8h, comparados com o controle, metanol, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão.



**Figura 7** – Níveis de expressão do gene *nodG*, obtidos por RT-qPCR, em *Rhizobium tropici* PRF 81, submetido ao tratamento de indução com naringenina (1,5  $\mu$ M) nos tempos de: 5 min, 15 min, 1 h, 4 h e 8h, comparados com o controle, metanol, utilizado como calibrador na RT-qPCR. Os valores foram normalizados pela expressão do gene referência 16S. Os traços verticais sobre as barras correspondem ao desvio padrão.

## 5 DISCUSSÕES

A etapa inicial da simbiose rizóbio-leguminosa envolve a secreção de compostos fenólicos pela planta, especialmente flavonóides que irão conduzir à expressão dos genes *nod* no rizóbio e, por conseguinte, a síntese dos fatores Nod, os quais especificamente engatilham várias respostas na planta para a formação dos nódulos fixadores de N<sub>2</sub> (BRENCIC; WINANS, 2005; HUNGRIA et al., 1997; LANG et al., 2008).

Os fatores Nod produzidos pelos rizóbios, em resposta a compostos exsudados pela planta hospedeira, são moléculas chave no estabelecimento da simbiose e, embora o feijoeiro seja considerado uma planta promíscua, por ser capaz de reconhecer uma ampla gama de fatores Nod, existe uma hierarquia de preferência, onde a acetil-fucose no extremo redutor é preferida sobre as demais modificações (LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998). A função dos genes *nod* ainda não está bem estabelecida em *R. tropici* PRF 81, necessitando de mais estudos. Porém, se esses genes estão sendo expressos, eles podem ter sim algum papel importante na nodulação do feijoeiro.

O gene *nodC*, presente na maioria dos rizóbios estudados até o presente momento, é responsável pela biossíntese da estrutura básica do fator Nod; além disso, ele não é expresso constitutivamente, sendo necessária a indução (ANGELINI et al., 2003; MULLIGAN; LONG, 1985). Mais especificamente, o gene *nodC* é responsável pelo controle da etapa de alongação da cadeia principal oligossacarídica dos fatores Nod (KAMST et al., 1997). Já o gene *nodG* é um gene envolvido na nodulação de um hospedeiro específico (*hsn*), sendo responsável pela modificação no esqueleto oligossacarídico do fator Nod (LÓPEZ-LARA; GEIGER, 2001). Não existem estudos sobre a expressão desse gene “*in vivo*”, ou seja, no próprio rizóbio, mas sabe-se que a proteína produzida por tal possui homologia com proteínas carregadoras do grupo acil (LÓPEZ-LARA; GEIGER, 2001). Este estudo apresenta, portanto, pela primeira vez, a resposta “*in vivo*” de *R. tropici* a flavonóides de sua planta hospedeira, através da técnica de RT-qPCR.

Mulligan e Long (1985), utilizando plasmídeos repórteres verificaram a expressão do gene *nodC* de *Ensifer meliloti* 1021 em resposta aos exsudatos de sua planta hospedeira *Medicago sativa*. A exposição do *nodC-lacZ* aos exsudatos resultou em uma indução de 30 vezes da atividade da β-galactosidase. Wei et al. (2008) verificaram a expressão da ilha simbiótica de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 em resposta a exsudatos de semente de soja (*Glycine max*) e genisteína (o principal indutor liberado por

sementes de soja para a indução dos genes *nod* de *B. japonicum*). Contudo, os níveis de expressão obtidos foram muito mais intensos para o tratamento com o exsudato. De modo similar, neste trabalho foi possível reportar aumento da expressão em até 130,122 e 16,78 vezes dos genes *nodC* e *nodG*, respectivamente, após a indução com exsudato de sementes de feijão, confirmando mecanismos de indução similares em *R. tropici*.

Devido à elevada sensibilidade da metodologia e dos vários fatores que podem interferir nos valores de Ct obtidos, relacionados à eficiência de amplificação, esperam-se valores elevados de SD e CV (%) para as análises de RT-qPCR. No caso de análise de quantificação de organismos geneticamente modificados (OGMs), por exemplo, valores de CV (%) variando de 20% a 35% são descritos com alta frequência (TAVERNIERS et al., 2004). Deste modo, embora tenham-se observado valores de SD e CV (%) elevados para os valores de RQ dos genes *nodC* e *nodG*, no tempo de 5 min no tratamento com exsudato, em todas as repetições biológicas, os valores de RQ na presença do indutor sempre foram superiores ao calibrador (água), confirmando a ativação dos mesmos pelo tratamento.

Angelini et al. (2003) também verificaram expressão do gene *nodC* na presença dos seguintes flavonóides: apigenina, crisina, daidzeína, genisteína, luteolina e naringenina. Cada flavonóide foi utilizado na concentração final de 3,7  $\mu\text{M}$ , um valor elevado em relação à concentração da naringenina utilizada neste trabalho (1,5  $\mu\text{M}$ ). Já em outro estudo, naringenina na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  foi utilizada como indutor dos genes *nodABC* em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* estirpe D923, microsimbionte de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Bohatyr), avaliação essa que também foi conduzida utilizando plasmídeos repórteres, com base na atividade da  $\beta$ -galactosidase (TSVETKOVA et al., 2006). Através de construções “*in vitro*”, com o uso de vetores de expressão e os genes *fabG* de *R. leguminosarum* LPR5045 e *nodG* de *Rhizobium* sp. N33, López-Lara e Geiger (2001) induziram a expressão das proteínas, FabG e NodG com naringenina na concentração final de 1,5  $\mu\text{M}$ . Contudo, não foi possível constatar expressão gênica diferencial dos genes *nodC* e *nodG*, neste trabalho, mediante o tratamento com naringenina. Considerando a elevada sensibilidade da técnica de RT-qPCR, uma explicação para o fato de não ter sido detectado alteração nos níveis de expressão dos genes *nod* em *R. tropici* PRF 81, na presença de tal flavonóide, pode ser a concentração utilizada. Até o momento não há nenhum trabalho reportando tal efeito da dose do flavonóide na expressão dos genes *nod* nesta bactéria. Ensaio futuros com doses superiores de naringenina, bem como outros flavonóides, devem ser testados, pois a concentração de indutor necessária para que ocorra a indução dos genes *nod*

em cada rizóbio é variável. Além disso, Begum et al. (2001) verificaram, também com base na atividade da  $\beta$ -galactosidase, que a combinação de naringenina 3  $\mu$ M e hesperetina 7  $\mu$ M resultou em melhor indução dos genes *nod* de *R. leguminosarum* (microsimbionte de ervilha, *Pisum sativum* L. e lentilha, *Lens culinaris* L.), comparado com naringenina e hesperetina sozinhos. Efeitos semelhantes na indução dos genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. phaseoli foram descritas para os flavonóides eriodictiol e naringenina em combinação com genisteína (Hungria et al., 1992). Neste estudo, ficou evidente que o tratamento com naringenina a 1,5  $\mu$ M não foi suficiente na indução dos genes *nodC* e *nodG* de *R. tropici* PRF 81 em nenhum dos tempos aplicados, baseado na análise estatística. Contudo, vale ressaltar que níveis de expressão máxima foram observados na presença desse flavonóide somente após 8 h de incubação para os dois genes. Apesar de não possuírem expressão estatisticamente diferentes em relação aos controles, biologicamente podem sim estarem desempenhando papel significativo. Talvez uma combinação com outro flavonóide tornasse mais eficiente o processo de indução ou, então, um aumento na concentração da naringenina poderia ser suficiente para alcançar um nível de expressão satisfatório. Também, em decorrência da concentração utilizada, um tempo maior de indução poderia ser conveniente para verificar tal processo, não avaliados neste trabalho. Contudo, uma imediata indução dos genes *nod* é considerada essencial para o início do processo de infecção pelo rizóbio.

No presente trabalho, foi comprovado que os genes *nodC* e *nodG* são funcionais em *R. tropici* PRF 81, sendo expressos na presença do indutor. Porém, tal expressão foi detectada como diferencial apenas com exsudato de sementes de feijão, no tratamento de 5 min de indução e o perfil de expressão de ambos genes foi muito semelhante. O fato de ter sido detectado apenas no tempo de 5 min pode ser explicado em decorrência de que em procariotos, mRNAs são transcritos e traduzidos em um único compartimento celular, e os dois processos estão estreitamente ligados, ocorrendo quase que simultaneamente. Além disso, mRNAs procarióticos são moléculas muito instáveis, possuem uma meia-vida de somente poucos minutos (em média, aproximadamente dois minutos), sendo traduzidos em proteínas antes mesmo que o processo de transcrição termine (ZAHA et al., 2003; LEWIN, 2004); e o processo de degradação do mRNA é iniciado tão logo termina a sua tradução. Desse modo, portanto, o rizóbio, ao entrar em contato com o exsudato, rapidamente sintetiza as proteínas envolvidas na síntese do fator Nod. Ademais, a queda brusca observada nos níveis após o pico máximo de expressão é coerente caso esteja ocorrendo um feedback negativo na síntese de tais fatores. Após atingir elevados níveis e suprir a quantidade suficiente das proteínas relacionadas à síntese do fator Nod, espera-se um controle para cessar

a síntese de mRNA, uma vez que tal molécula começa a ser traduzida nas diferentes proteínas antes mesmo do processo de transcrição terminar (ZAHA, 2003; LEWIN, 2004). No entanto, tal resultado de feedback negativo não foi reportado até o momento na literatura, uma vez que os flavonóides são tidos como indutores da nodulação. Vale ressaltar que, os exsudatos são compostos por uma combinação de indutores fortes e fracos (MULLIGAN; LONG, 1985; FIRMIN et al., 1986; PETERS et al., 1986; REDMOND et al., 1986; HARTWIG et al., 1989, 1990; HUNGRIA et al., 1992), os quais podem estar atuando de maneira sinérgica ativando com maior intensidade a expressão dos genes *nod* após 5 min de indução; além disso, como os níveis alcançaram um pico bastante elevado é coerente observar tal feedback negativo para a interrupção da síntese das proteínas de nodulação após esse tempo, sendo evidenciado pela inibição da expressão (DOWN) para o gene *nodG* no tempo de 15 min, o qual retoma a um nível basal de expressão nos demais tempos avaliados. Segundo Hartwig et al. (1989), a presença de concentrações sub-ótimas de diferentes indutores podem resultar em um aumento sinérgico na expressão do gene. Embora, existam relatos de que a transcrição dos genes *nod* pode ser inibida por uma interação complexa entre os próprios indutores liberados pela planta (MERCANTE et al., 2002), nesse estudo foi evidenciado uma forte indução dos genes quando tratados com exsudatos de sementes de feijão. Vale ressaltar, também, que a composição dos flavonóides exsudados pela raiz difere daqueles exsudados pelas sementes, o que pode indicar que os genes *nodC* e *nodG* respondem mais rapidamente quando em contato com os indutores da semente. Análises cromatográficas por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) demonstraram que a maioria dos exsudatos de raízes e sementes de leguminosas contêm um número variável de indutores, por exemplo, no caso dos exsudatos de raiz de ervilhaca (*Vicia sativa*), nove indutores são encontrados (ZAAT et al., 1989). No caso do feijoeiro, o número de indutores é surpreendente. As antocianidinas (delfinidina, petunidina e malvidina) e os flavonóis (miricetina, quercetina e canferol) são o principal grupo de compostos indutores liberados pelas sementes. Já nos exsudatos radiculares, eriodictiol, naringenina e genisteína são os principais indutores encontrados (HUNGRIA et al., 1991a,b), além da chalcona isoliquiritigenina e a correspondente flavanona liquiritigenina (BOLANÕS-VÁSQUEZ; WERNER, 1997). Contudo, nos estudos realizados por Hungria et al. (1991a,b) e por Bolanõs-Vásquez e Werner (1997), a atividade biológica de todos os indutores identificados foi demonstrada pela indução da atividade da  $\beta$ -galactosidase em *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Por isso, a importância em estudar a resposta dos genes *nod* de *R. tropici* PRF 81 a esses compostos pela metodologia apresentada neste trabalho.

Já a inibição da expressão (DOWN) do gene *nodC* nos tempos de 5 min e 1 h na presença da naringenina pode ter acontecido devido ao metanol presente na solução estoque desse flavonóide. Contudo, é reportado seu uso como solvente para os flavonóides nos estudos de indução dos genes *nod* em rizóbios (LANG et al., 2008). Ademais, a concentração utilizada nesse estudo, como citado anteriormente, pode ter sido baixa, incapaz de induzir os genes *nodC* e *nodG* de *R. tropici* PRF 81. Porém, não foi observado perfil semelhante de inibição para o gene *nodG* tratado com naringenina.

*R. tropici* é uma bactéria isolada de feijoeiro cultivado em regiões tropicais. No caso da estirpe PRF 81, ela apresenta alta eficiência de FBN, é competitiva e estável geneticamente, além de ser tolerante às condições de altas temperaturas e acidez do solo. A estirpe vem sendo utilizada em inoculantes comerciais no Brasil desde 1998, uma vez que se comprovou, em diversos ensaios a campo, a capacidade de aumentar, consistentemente, o rendimento da cultura (HUNGRIA et al., 2000, 2005).

Em um estudo inicial do genoma da estirpe PRF 81, foi identificado que este é formado por um cromossomo de 5.305 kb (67,6 %) e, com base na análise do perfil plasmidial desta estirpe (PINTO et al., 2009), foram identificados 4 plasmídeos com tamanhos em torno de 1700, 510, 185 e 150 kb (2.545 kb), correspondendo a 32,4 % do genoma. Vários genes de nodulação foram identificados por Pinto et al. (2009) na estirpe PRF 81, dentre eles os genes *nodC* e *nodG*. O gene *nodC* apresentou similaridade elevada com a estirpe tipo de *R. tropici* CIAT 899; já o gene *nodG*, com *R. leguminosarum*. Foram encontrados homólogos desses genes na maioria dos rizóbios sequenciados, sendo que *nodC* foi encontrado em *M. loti*, *B. japonicum*, *E. meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* e NGR234; enquanto o *nodG* foi identificado em *M. loti*, *E. meliloti*, *R. etli* e *R. leguminosarum*.

Contudo, embora presentes no genoma (PINTO et al., 2009), esses genes poderiam não ser funcionais e este estudo apresenta fortes indicações de que os genes *nodC* e *nodG* da estirpe PRF 81 de *R. tropici* são funcionais e devem estar relacionados à nodulação do feijoeiro.

## 6 CONCLUSÕES

- Os genes *nodC* e *nodG* da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici* são funcionais e apresentaram níveis de expressão gênica diferencial em presença de exsudato de sementes de sua respectiva leguminosa hospedeira, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

- A maior expressão ocorreu aos 5 minutos de contato com o exsudato, indicando uma resposta imediata ao indutor.

- O exsudato de sementes de feijão foi identificado como melhor indutor dos genes *nod* quando comparado com naringenina, nos tempos avaliados neste trabalho.

- Na dose de 1,5  $\mu$ M, o flavonóide naringenina não foi capaz de induzir a expressão dos genes *nodC* e *nodG*, essenciais para o processo de nodulação, nos diferentes tempos avaliados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.996-1006, 1997.

ANGELINI, J.; CASTRO, S.; FABRA, A. Alterations in root colonization and *nodC* gene induction in the peanut-rhizobia interaction under acidic conditions. **Plant physiology and biochemistry**, v.41, p.289-294, 2003.

ARAÚJO, A.S.F; CARVALHO, E.M.S. **Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Teresina: UFPI, 2006. p.1-4. (Comunicado Técnico, 110).

BAEV, N. et. al. A. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. **Molecular and General Genetics**, v.228, p.113-124, 1991.

BAEV, N. et. al. A. *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7555-7565, 1992.

BARNY, M.P.; DOWNIE, J.A. Identification of the NodC protein in the inner but not the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.6, p.669-672, 1993.

BEGUN, A.A. et. al.. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1537-1543, 2001.

BERINGER, J.E. A factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

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

BOLANÕS-VÁSQUEZ, M.C.; WERNER, D. Effects os *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod* gene-inducing flavonoids in root exsudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.339-346, 1997.

BRENCIC, A.; WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.155-194, 2005.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.5641-5652, 2000.

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V. Análise serial da expressão gênica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.88-100, 2004.

CANTER-CREMERS, H.C.J. et. al. Sym plasmid and chromosomal gene products of *Rhizobium trifolii* elicit developmental responses on various legume roots. **Journal of Plant Physiology**, v.122, p.25-40, 1986.

CANTER-CREMERS, H.C.J. et. al. Additional nodulation genes on the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Plant Molecular Biology**, v.13, p.163-174, 1989.

CHO, M.J.; HARPER, J.E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiology**, v. 95, p.435-442, 1991.

CLOUTIER, J.; LABERGE, S.; ANTOUN, H. Sequence and mutational analysis of the 6.7-Kb region containing *nodAFEG* genes of *Rhizobium* sp. Strain n.33: evidence of DNA rearrangements. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p.401-406, 1997.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Brasília). **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos: safra 2008/2009, quinto levantamento, fevereiro/2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 de fev. 2009.

COSTA, J.G.C.; VIEIRA, N.R.A. Aspectos conjunturais da cultura. In: YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. (Ed.). **Cultura do feijoeiro no Brasil**: características da produção. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000a. p. 9-30.

\_\_\_\_\_. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. (Ed.). **Cultura do feijoeiro no Brasil**: características da produção. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000b. p.51-64.

DAKORA, F.D.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.665-668, 1993.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

DÉBELLÉ, F. et. al. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.1075-1086, 1986.

DÉNARIÉ, J.; DÉBELLÉ, F. ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.497-531, 1992.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews, Microbiology**, v.2, p.621-631, 2004.

DJORDJEVIC, M.A.; SCHOFIELD, P.R.; ROLFE, B.D. Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host range ability. **Journal of Bacteriology**, v.156, p.1035-1045, 1985.

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 Journal**, v.6, p.1173-1179, 1987.

DOWNIE, J.A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: ESPANHAK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.387-402.

DRAHOS, D.J.; HEMMING, B.C.; MCPHERSON, S. Tracking recombinant organisms in the environment:  $\beta$ -galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonas. **Biotechnology**, v.4, p.439-444, 1986.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.), **Biologia dos solos do cerrados**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1997, p.19-65.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão). **Cultivo do feijoeiro comum**: características da cultura. Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijão/CultivodoFeijoeiro/index.htm> >. Acesso em: 26 out. 2007a.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa Agrobiologia). **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro.** Disponível em: <[http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbnl\\_inocula\\_feijoeiro.html](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbnl_inocula_feijoeiro.html)>. Acesso em: 24 out. 2007b.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Novas estirpes de bactéria dobram rendimento do feijoeiro.** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/abril/foldernoticia.2007-04-23.6159564463/noticia.2007-04-25.1804>>. Acesso em: 24 out. 2007c.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Inoculante é distribuído no Agrishow.** Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/julho/1a-semana/noticia.2007-07-06.7707155228>>. Acesso em: 10 nov. 2007d.

FARREL, R.E. **RNA Methodologies:** a laboratory guide for isolation and characterization. 2<sup>nd</sup>. California: Academic Press, 1998.

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**, v.324, p.90-92, 1986.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v.387, p.394-401, 1997.

GAGNON, H.; IBRAHIM, R.K. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini* and *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.988-998, 1998.

GEPTS, P. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabacea) beans. **Economic Botany**, v.44, p.28-38, 1990.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p.503-512, 2002.

GIRARD, M.L. et. al. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.2411-2419, 1991.

GIRAUD, E. et. al. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v.316, p.1307-1312, 2007.

GÖTTFERT, M. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.104, p.39-64, 1993.

GRANGE, L. **Análise polifásica na reclassificação filogenética de *Rhizobium etli* e o estudo da genética de isolados dos cerrados brasileiros**. 153f. Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

GYÖRGYPAL, Z.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. Diverse signal sensitivity of NodD protein homologs from narrow and broad host range rhizobia. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, p.356-364, 1991.

HADRI, A.E. et. al. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYAKAAS, P.J.J. (Ed.), **The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.347-360.

HARTWIG, U.A. et. al. A. Interactions among flavonoid *nod* gene inducers released from alfafa seeds and roots. **Plant Physiology**, v.91, p.1138-1142, 1989.

HARTWIG, U.A. et. al. Chrysoeriol and luteolin released from alfafa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.92, p.116-122, 1990.

HORVATH, B. et. al. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* genes determining host specificity for alfafa. **Cell**, v.46, p.335-343, 1986.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v.97, p.751-758, 1991a.

\_\_\_\_\_. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v.97, p.759-764, 1991b.

\_\_\_\_\_ Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p.199-203, 1992.

HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D.A. Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.418-422, 1993.

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.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.189-295.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p. 819-830, 1997.

HUNGRIA, M. et. al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, n.11, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M., CAMPO, R.J., MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.11-48. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

\_\_\_\_\_ Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. Inoculant Preparation, Production and Application. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.), **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht: Kluwer, 2005. p.223-253.

HUNGRIA, M., CAMPO, R.J., MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007 (Embrapa Soja, Documentos, 283).

INNES, R.W. et. al. Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *R. trifolii*. **Molecular and General Genetics**, v.201, p.426-432, 1985.

JAMES, P. Protein identification in the post-genomic era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v.30, p.279-331, 1997.

JORDAN, D. C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R., HOLT, J.G., (eds.) **Bergey's manual os systematic bacteriology**. Baltimore/London: Willians & Wilkins Co., 1984, p. 235-244.

KAMI, J. et. al. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v.92, p.1101-1104, 1995.

KAMST, E. et. al. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in nod factor biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v.179, p.2103-2108, 1997.

KANEKO, T. et. al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v.7, p.331-338, 2000.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; BRANDT, S.; WERNER, D. Isoliquiritigenin, a strong *nod*-gene and glyceollin resistance inducing flavonoid from soybean root exudate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1705-1710, 1992.

KAPULNIK, Y.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfafa. **Plant Physiology**, v.84, p.1193-1196, 1987.

KONDOROSI, E. et. al. A. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. **EMBO Journal**, v.5, p.1331-1340, 1989.

KOSSLAK, R.M. et. al. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavone isolated from *Glycine max*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v.84, p.7428-7432, 1987.

KOSSLAK, R.M. et. al. Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1333-1341, 1990.

KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. Ineffective nodulation of *Sesbania macrocarpa* by *Sinorhizobium meliloti* strain RCR2011. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.207-214, 1998.

LAEREMANS, T.; VANDERLEYDEN, J. Review: infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.787-808, 1998.

LAM, S.T.; ELLIS, D.M.; LIGON, J.M. Genetic approaches for studying rhizosphere colonization. **Plant and Soil**, v.129, p.11-18, 1990.

LANG, K.; LINDEMANN, A.; HAUSER, F.; GÖTTFERT, M. The genistein stimolon of *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.279, p.203-211, 2008.

LEWIN, B. **Lewin: Genes VIII**. 8<sup>a</sup> ed. Pearson Prentice Hall: Upper Saddle, 2004. 988p.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.10-17, 2003.

LONG, S.R. Genetic analysis of *Rhizobium* nodulation. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**, 1992. p.560-597.

LÓPEZ-LARA, I.M.; GEIGER, O. The nodulation protein NodG shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.349-357, 2001.

MANYANI, H.; SOUSA, C.; SORIA DIAZ, M.E.; GIL-SERRANO, A.; MEGIAS, M. Regulation of *nod* factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.574-579, 2001.

MARCELINO, F.C. **Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 145f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARIE, C. BARNY, M.A.; DOWNIE, J.A. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, GlmS and NodM, required for nodulation and development of nitrogen-fixing nodules. **Molecular Microbiology**, v.6, p.843-851, 1992.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. et. al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.

MAXWELL, C.A. et. al. A chalcone and two related flavonoids released from alfafa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.91, p.842-847, 1989.

MERCANTE, F.M; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Rural**, v.22, p.65-81, 2002.

MORGANTE, P.G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**, 2003. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/MetNitro.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2007.

MULLIGAN, J.T.; LONG, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v.82, p.6609-6613, 1985.

NAKANISHI, K.; NUREKI, O. Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. **Molecules and Cells**, v.19, p.157-166, 2005.

PECK, M.C.; FISHER, R.F.; LONG, S.R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 5417-5427, 2006.

PEREIRA, S.S. **Análise da expressão de fatores de transcrição relacionados com tolerância à seca em raízes de soja**. 127f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v.233, p.977-980, 1986.

PETERS, N.K.; LONG, S.R. Alfafa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Plant Physiology**, v.88, p.396-400, 1988.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.1-10, 2002.

PHILLIPS, D.A. Flavonoids: plant signals to microbes. In: STAFFORD, H.A.; IBRAHIM, R.K. (ed.). **Metabolism in Plants**, 1992. p.201-231.

PHILLIPS, D.A.; JOSEPH, C.M.; MAXWELL, C.A. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. **Science**, v.99, p.1526-1531, 1992.

PINTO, F.G.S. **Genômica e diversidade de *Rhizobium tropici*, uma espécie tropical microssimbionte do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 128f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

PINTO, F.G.S. et. al. Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. **Functional & Integrative Genomics**, v.9, p.263-270, 2009.

POUPOT, R.; MARTINEZ-ROMERO, E.; GAUTIER, N.; PROMÉ, J.C. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.6050-6055, 1995a.

POUPOT, R. et. al.. *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity of activated form of sulfate. **FEBS Letters**, v.368, p.536-540, 1995b.

RASMUSSEN, M.O. et. al. New access to lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.2, p.1908-1910, 2004.

REDMOND, J.W. et. al. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632-635, 1986.

RHIJN, P.V.; VANDERLEYDEN, J. The *rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, v.59, p.124-142, 1995.

RICHARDSON, A.E. et. al. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2541-2548, 1988.

ROCHA, T.L. et. al. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 12p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 136).

ROSSEN, L. et. al. The *nodD* gene of *Rhizobium leuminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA,B,C* genes. **EMBO Journal**, v.4, p.3369-3373, 1985.

SADOWSKY, M.J. et. al. *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.637-641, 1991.

SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.5177-5182, 1992.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

SPAINK, H.P. et. al. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. **Nature**, v.354, p.125-130, 1991.

SPAINK, H.P. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.977-986, 1992.

SPAINK, H.P.; WIJFJES, A.H.M.; LUGTENBERG, B.J.J. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.6276-6281, 1995.

STACEY, G. et. al. Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.110-121, 2006.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G. **Variabilidade genética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L)**: aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documento 126, 2000, p.59.

SURIN, B.P.; DOWNIE, J.A. Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes *nodLMN* involved in efficient host-specific nodulation. **Molecular Microbiology**, v.2, p.173-183, 1988.

SWANSON, J.A. et. al. Extended region of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* 1021. I. Phenotypes of *Tn5* insertion mutants. **Genetics**, v.117, p.181-189, 1987.

TAVERNIERS, I.; BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.1198-1207, 2004.

TSVETKOVA, G.; TEOFILOVA, T.; GEORGIEV, G.I. Effect of naringenin and quercetin on activity of *nodABC* genes of strain D293 and following nodulation and nitrogen fixation response of inoculated pea plants (*Pisum sativum* L.). **Gen Appl Plant Physiology**, p.67-71, 2006.

VALVERDE, A. et. al. E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.

VAN BRUSSEL, A.A.N. et. al. Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor which causes thick and short roots on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v.165, p.517-522, 1986.

VILLAS-BÔAS, S.G.; GOMBERT, A.K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biociência**, v.36, p.58-69, 2006.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

ZAAT, S.A.J. et. al. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.3388-3391, 1987a.

ZAAT, S.A.J. et. al. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plants flavanones and flavones. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.198-204, 1987b.

ZAAT, S.A.J. et. al. Analysis of the major inducers of the *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes. **Plant Molecular Biology**, v.13, p.175-188, 1989.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**, 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 424 p.

ZHANG, X.X. et. al. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. **Applied Environment Microbiology**, v.66, p.2988-2995, 2000.

WEI, M. et. al. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **DNA Research**, v.15, p.201-214, 2008.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v.14, p.61-65, 1996.

**ANEXOS**

ANEXOS A – TABELAS DE ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR DOS GENES *NODC* E *NODG*.**Tabela A** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 5min, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQ <sub>mín</sub> /RQ <sub>máx</sub>	RQ Geral	SD Geral
1	Naringenina	35,1048 35,0106 35,0405	35,052	0,05	19,3909 19,5256 19,5008	19,472	0,072	15,580	0,061	0,770	0,061	0,59661291	0,57267544 0,62155094	0,48059487	0,11183581
	Metanol	33,5902 34,6448 35,4399	34,558	0,93	19,892 19,7465 19,6082	19,749	0,142	14,809	0,664	0	0,664	1,00000000			
2	Naringenina	35,6017 35,4088 36,502	35,838	0,58	18,8333 18,7206 18,5327	18,696	0,152	17,142	0,426	1,469	0,426	0,37347262	0,28059729 0,49708889		
	Metanol	37,1753 35,9632 37,6442	36,928	0,87	21,4997 21,2003 21,0626	21,254	0,223	15,673	0,633	0	0,633	1,00000000			
3	Naringenina	34,5107 34,8281 34,7489	34,696	0,17	16,8016 16,7792 16,6622	16,748	0,075	17,948	0,128	1,120	0,128	0,47169908	0,43282378 0,51406607		
	Metanol	35,698 36,0217 35,478	35,733	0,27	19,0245 18,918 18,7718	18,905	0,127	16,828	0,213	0	0,213	1,00000000			

**Tabela B** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 5 min, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	32,8468 34,2429 33,3921	33,494	0,70	22,7546 22,4622 23,0327	22,750	0,285	10,744	0,537	-7,566	0,537	159,86155961	111,52688212  229,14402121	121,969 28947	53,58776 234	43,935455 04
	Água	36,2694 36,2241 36,2307	36,241	0,02	17,9661 17,9396 17,8873	17,931	0,040	18,310	0,033	0	0,033	1,00000000				
2	Exsudato	37,1407 36,8261 37,7864	37,251	0,49	24,224 24,0063 24,0175	24,083	0,123	13,168	0,357	-3,893	0,357	13,61178991	10,71458294  17,29239724	excluí		
	Água	34,9824 36,0519 35,9788	35,671	0,60	18,5611 18,6579 18,6092	18,609	0,048	17,062	0,424	0	0,424	1,00000000				
3	Exsudato	38,3292 38,4811 38,32343	38,378	0,09	26,2743 26,2355 26,4179	26,309	0,096	12,069	0,093	-6,608	0,093	84,07701933	79,00341412  89,47645186			
	Água	38,5602 40,2023 38,5602	39,108	0,95	20,4116 20,5416 20,339	20,431	0,103	18,677	0,674	0	0,674	1,00000000				

**Tabela C** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 5min, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	32,3615 32,0599 32,2698	32,230	0,15	19,3909 19,5256 19,5008	19,472	0,072	12,758	0,121	0,897	0,121	0,54777955	0,50525064 0,59388829	1,64473558	0,471071972	28,64119795
	Metanol	31,2018 31,9007 31,7257	31,609	0,36	19,892 19,7465 19,6082	19,749	0,142	11,861	0,276	0	0,276	1,00000000	0,83099864 1,20337141			
2	Naringenina	31,9533 32,1839 32,218	32,118	0,14	24,4741 24,0904 24,0597	24,208	0,231	7,910	0,192	-0,404	0,192	1,31163739	1,15284323 1,49230407			
	Metanol	32,0144 31,3844 31,5927	31,664	0,32	23,6105 23,2498 23,1867	23,349	0,229	8,315	0,279	0	0,279	1,00000000	0,82954183 1,20548472			
3	Naringenina	33,9205 33,7859 33,2954	33,667	0,33	17,963 17,8517 17,8145	17,876	0,077	15,791	0,239	-1,017	0,239	1,97783376	1,68495319 2,32162318			
	Metanol	36,7735 36,116 34,2341	35,708	1,32	19,1382 19,075 18,487	18,900	0,359	16,808	0,966	0	0,966	1,00000000	0,52319776 1,91132316			

**Tabela D** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 5 min, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	30,191 31,3702 31,7274	31,096	0,80	22,7546 22,4622 23,0327	22,750	0,285	8,346	0,603	-5,812	0,603	49,30130460 excluir	32,89704767 73,88561612	14,85664036	2,155295932	14,5072902
	Água	32,0723 32,0886 32,1079	32,090	0,02	17,9661 17,9396 17,8873	17,931	0,040	14,159	0,031	0	0,031	1,00000000	0,97940649 1,02102652			
2	Exsudato	33,6603 32,9177 32,4892	33,022	0,59	21,7665 21,1916 21,8265	21,595	0,351	11,428	0,487	-3,862	0,487	13,33261599	9,61899245 18,47996556			
	Água	31,4851 32,4276 31,5231	31,812	0,53	16,3428 16,6752 16,5484	16,522	0,168	15,290	0,395	0	0,395	1,00000000	0,76703955 1,30371375			
3	Exsudato	36,8555 36,3627 37,0272	36,748	0,34	26,2743 26,2355 26,4179	26,309	0,096	10,439	0,253	-4,169	0,253	16,38066473	13,82250191 19,41227274			
	Água	35,0402 35,0884 34,9891	35,039	0,05	20,4116 20,5416 20,339	20,431	0,103	14,609	0,081	0	0,081	1,00000000	0,94736245 1,05556220			

**Tabela E** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 4h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	35,3917 37,1699	36,281	1,26	24,7319 24,8222	24,777	0,064	11,504	0,890	2,037	0,890	0,25506424	0,14039724 0,46338351	0,28971049	0,044787	15,45924006
	Metanol	35,5877 35,2012	35,394	0,27	26,0015 25,8543	25,928	0,668	9,467	0,510	0	0,510	1,00000000				
2	Naringenina	42,9504 44,4653 41,3685	42,928	0,15	15,4803 15,2701 15,1912	15,314	0,149	27,614	0,149	1,932	0,149	0,27378295	0,24767477 0,30264327			
	Metanol	41,9261 41,9261 43,1885	42,347	0,19	16,7992 16,742 16,4517	16,664	0,186	25,683	0,186	0	0,186	1,00000000				
3	Naringenina	44,5459 38,353 38,353	40,417	3,58	14,8126 14,6011 14,5176	14,644	0,152	25,774	2,531	1,607	2,531	0,34028428	0,06234568 1,85728014			
	Metanol	40,31 37,8619 37,4373	38,536	1,55	14,4429 14,3642 14,3036	14,370	0,070	24,166	1,098	0	1,098	1,00000000				

**Tabela F** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 4 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	38,0364 39,2048 41,894	39,712	1,98	16,3826 16,2852 16,2612	16,310	0,064	23,402	1,399	-0,513	1,399	1,41035319	0,55171624 3,60528832	1,60009160	0,2683306	16,76970498
	Água	43,8407 41,3358 41,3108	42,162	1,45	18,2952 18,2265 18,2213	18,248	0,041	23,915	1,028	0	1,028	1,00000000				
2	Exsudato	41,8605 41,7348 40,9357	41,510	0,50	17,2491 16,952 16,8464	17,016	0,209	24,495	0,384	-0,868	0,384	1,78983002	1,38329268 2,31584504			
	Água	42,4988 42,4988 44,0499	43,016	0,90	17,3105 17,8953 17,7542	17,653	0,305	25,363	0,669	0	0,669	1,00000000				
3	Exsudato	39,3245 37,8744 36,731	37,977	1,30	14,3467 14,2208 14,1946	14,254	0,081	23,723	0,921	-2,243	0,921	4,50011208	2,42667770 8,34515798	excluí		
	Água	40,1083 37,0854 43,6581	40,284	3,29	14,3764 14,3277 14,2516	14,319	0,063	25,965	2,327	0	2,327	1,00000000				

**Tabela G** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 4h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	34,5437 34,6995 35,0635	34,769	0,27	18,4964 18,3595 18,3082	18,388	0,097	16,381	0,201	0,388	0,201	0,77106156	0,67392277 0,88220187	0,88655718	0,45469817	51,28808167
	Metanol	34,6474 35,1036 34,5781	34,776	0,29	18,637 18,5643 19,1482	18,783	0,318	15,993	0,302	0	0,302	1,00000000				
2	Naringenina	34,7956 34,7203 34,2442	34,587	0,30	15,4803 15,2701 15,1912	15,314	0,149	19,273	0,236	1,031	0,236	0,50074440	0,42734192 0,58675488			
	Metanol	35,1781 34,7877 34,7516	34,906	0,24	16,7992 16,742 16,4517	16,664	0,186	18,242	0,213	0	0,213	1,00000000				
3	Naringenina	34,0096 34,0095 34,2869	34,102	0,16	14,8126 14,6011 14,5176	14,644	0,152	19,458	0,156	-0,489	0,156	1,38786558	1,24988173 1,54108251			
	Metanol	34,3922 34,4401 34,1193	34,317	0,17	14,4429 14,3642 14,3036	14,370	0,070	19,947	0,132	0	0,132	1,00000000				
Repetição em placa	Naringenina	33,6898 33,6273	33,659	0,04	24,1602 24,3304	24,245	0,12	9,413	0,091	0,826	0,091	0,57451919	0,57451919 1,00000000			
	Metanol	34,0244 33,7958	33,910	0,16	25,3805 25,266	25,323	0,08	8,587	0,128	0	0,128	1,00000000				

**Tabela H** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 4 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	34,3611 34,8066 34,601	34,590	0,22	16,3826 16,2852 16,2612	16,310	0,064	18,280	0,164	1,856	0,164	0,28793819	0,25793345 0,32143331	0,53129535	0,328041238	61,7436686
	Água	34,4987 34,9539 34,5608	34,671	0,25	18,2952 18,2265 18,2213	18,248	0,041	16,423	0,177	0	0,177	1,00000000	0,88809123 1,12601044			
2	Exsudato	35,5402 34,8221 34,7717	35,045	0,43	17,2491 16,952 16,8464	17,016	0,209	18,029	0,338	1,360	0,338	0,40158970	0,32015247 0,50374215			
	Água	34,3057 34,5663 34,0934	34,322	0,24	17,3105 17,8953 17,7542	17,65333333	0,305	16,668	0,273	0	0,273	1,00000000	0,83260765 1,20104589			
3	Exsudato	34,1522 34,2768 34,2308	34,220	0,06	14,3467 14,2208 14,1946	14,254	0,081	19,966	0,073	0,150	0,073	0,90435814	0,86130066 0,94956812			
	Água	34,1669 34,1325 34,1043	34,135	0,03	14,3764 14,3277 14,2516	14,319	0,063	19,816	0,050	0	0,050	1,00000000	0,96722140 1,03388945			

**Tabela I** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 8h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	41,5613 41,2075 38,1418	40,304	1,88	18,1475 17,9801 17,7473	17,958	0,201	22,345	1,337	-0,847	1,337	1,76448392	0,71966665 4,32617449	1,97645248	0,299768816	15,16701354
	Metanol	42,5876 40,759 40,3605	41,236	1,19	18,1127 18,0458 17,9727	18,044	0,070	23,192	0,841	0	0,841	1,00000000				
2	Naringenina	38,0735 44,197 36,3971	39,556	4,11	14,6955 14,6304 14,4569	14,594	0,123	24,962	2,905	-1,168	2,905	2,18842105	0,31200138 1,00000000			
	Metanol	43,5061 39,7545 38,0978	40,453	2,77	14,3834 14,3172 14,2696	14,323	0,057	26,129	1,960	0	1,960	1,00000000				
3	Naringenina	34,79 35,1706	34,980	0,27	24,6858 24,2363	24,461	0,32	10,519	0,294	-0,815	0,294	1,72709757	1,41756579 2,10421698			
	Metanol	35,3463 36,3159	35,831	0,69	24,4691 24,525	24,497	0,04	11,334	0,486	0	0,486	1,00000000				

**Tabela J** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 8 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	40,6218 39,0866 43,5648	41,091	2,28	17,3926 17,4627 17,4353	17,430	0,035	23,661	1,609	1,572	1,609	0,34842064	0,11840496  1,02526906	0,30801871	0,057136958	18,54983363
	Água	39,0612 39,6276 40,1013	39,597	0,52	17,5342 17,5087 17,481	17,508	0,027	22,089	0,369	0	0,369	1,00000000				
2	Exsudato dados perdidos	40,784	40,784	#DIV/0!		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
	Água	43,1627 43,1627 43,1627	43,163	0,00	14,9486 14,9046 14,83	14,894	0,060	28,268	0,042	0	0,042	1,00000000				
3	Exsudato	37,8962 37,5456 44,2068	39,883	3,75	14,2529 14,1047 15,4594	14,606	0,743	25,277	2,702	1,966	2,702	0,26761678	0,04369571  1,63903355			
	Água	37,161 38,5976 39,1257	38,295	1,02	14,9433 15,1519 14,8542	14,983	0,153	23,312	0,727	0	0,727	1,00000000				

**Tabela K** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 8h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	34,6741 34,6922 34,8557	34,741	0,10	18,1475 17,9801 17,7473	17,958	0,201	16,782	0,159	0,226	0,159	0,85914989	0,77238154  0,95566568	1,61380542	1,049987176	65,06281119
	Metanol	34,5452 35,0391 34,2149	34,600	0,41	18,1127 18,0458 17,9727	18,044	0,070	16,556	0,297	0	0,297	1,00000000				
2	Naringenina	35,0688 34,6844 34,92	34,891	0,19	16,2959 16,6769 16,533	16,502	0,192	18,389	0,193	-1,542	0,193	2,81292656	2,47123275  3,20186587			
	Metanol	34,6612 35,1337 35,2345	35,010	0,31	15,1608 15,1183 14,9565	15,079	0,108	19,931	0,229	0	0,229	1,00000000				
3	Naringenina	34,6661 34,4129 34,5364	34,538	0,13	14,6955 14,6304 14,4569	14,594	0,123	19,944	0,125	-0,233	0,125	1,16933982	1,07532044  1,27157968			
	Metanol	34,716 34,6202 34,1664	34,501	0,29	14,3834 14,3172 14,2696	14,323	0,057	20,177	0,211	0	0,211	1,00000000				
Repetição na placa	Naringenina	33,6005 33,3245	33,463	0,20	24,0723 24,2423	24,157	0,12	9,305	0,162	-0,516	0,162	1,41324098	1,41324098 1,00000000			
	Metanol	33,5856 33,9027	33,744	0,22	23,9082 23,9382	23,923	0,02	9,821	0,159	0	0,159	1,00000000				

**Tabela L** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 8 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	34,3631 34,5462 34,2681	34,392	0,14	17,3926 17,4627 17,4353	17,430	0,035	16,962	0,103	-0,282	0,103	1,20832357	1,12765283 1,29476539	1,09034356	0,16693571	15,31037704
	Água	34,7059 34,7302 34,8211	34,752	0,06	17,5342 17,5087 17,481	17,508	0,027	17,244	0,047	0	0,047	1,00000000				
2	Exsudato	34,1329 34,2388 34,4739	34,282	0,17	14,2529 14,1047 15,4594	14,606	0,743	19,676	0,540	-0,226	0,540	1,16336896	0,81006432 1,67076528			
	Água	34,5699 35,0876 34,9974	34,885	0,28	14,9433 15,1519 14,8542	14,983	0,153	19,902	0,223	0	0,223	1,00000000				
3	Exsudato	33,8286 34,1759	34,00225	0,245578185	23,2742 23,6724	23,4733	0,28156992	10,52895	0,264187684	0,1582	0,264187684	0,899338142	0,753314425 1,073667339			
	Água	33,7276 33,7	33,7138	0,019516147	23,3837 23,3024	23,34305	0,057487781	10,37075	0,042928574	0	0,042928574	1,00000000				

**Tabela M** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 48 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	38,3994 39,1333 36,0506	37,861	1,61	19,9069 19,7125 19,6884	19,769	0,120	18,092	1,142	-0,059	1,142	1,04017531	0,48366750 2,23700102	0,83599141	0,147819108	17,68189326
	Metanol	37,0368 38,8783 36,4208	37,445	1,28	19,3539 19,2788 19,2515	19,295	0,053	18,151	0,905	0	0,905	1,00000000				
2	Naringenina	34,4797 34,1554 34,4549	34,363	0,18	17,5198 17,6622 17,4203	17,534	0,122	16,829	0,154	0,556	0,154	0,68894867	0,62139204 0,76384993			
	Metanol	33,7982 33,5148 33,7701	33,694	0,16	17,4717 17,4342 17,3562	17,421	0,059	16,274	0,118	0	0,118	1,00000000				
3	Naringenina	33,5671 33,4203 33,8542	33,614	0,22	17,1125 17,0143 16,9705	17,032	0,073	16,581	0,164	0,351	0,164	0,79000999	0,70758097 0,88204151			
	Metanol	33,2641 33,213 33,229	33,235	0,03	17,0286 16,9970 16,9906	17,005	0,020	16,230	0,023	0	0,023	1,00000000				
Repetição na placa	Naringenina	32,9008 32,8053	32,853	0,07	25,8987 25,8987	25,899	0,000	6,954	0,048	0,287	0,048	0,82483165	0,798836235 0,851672997			
	Metanol	32,7558 33,3662	33,061	0,43	26,6872 26,1004	26,394	0,415	6,667	0,423	0	0,423	1,00000000				

**Tabela N** – Expressão gênica relativa do gene *nodC* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 48 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodC</i>	Média Ct <i>nodC</i>	SD <i>nodC</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	37,2799 36,8986 38,1130	37,431	0,62	19,8351 19,8990 19,7391	19,824	0,080	17,606	0,443	-0,956	0,443	1,89876668	1,41090142 2,55532729	1,87956508	0,301503765	16,04114533
	Água	40,0303 37,2249 36,9135	38,056	1,72	19,5031 19,4769 19,5021	19,494	0,015	18,562	1,214	0	1,214	1,00000000				
2	Exsudato	34,3249 35,2901 34,474	34,696	0,52	17,1267 16,9313 17,0706	17,043	0,101	17,653	0,374	-0,801	0,374	1,71172280	1,33178916 2,20004414			
	Água	35,2193 35,7511 35,2461	35,406	0,30	16,9271 17,0308 16,8938	16,951	0,071	18,455	0,218	0	0,218	1,00000000				
3	Exsudato	34,0658 34,2518 33,7439	34,021	0,26	16,4280 16,4624 16,3681	16,420	0,048	17,601	0,185	-0,712	0,185	1,61247159	1,42451063 1,82523357			
	Água	34,4441 35,4424 34,5834	34,823	0,54	16,5552 16,4597 16,5148	16,510	0,048	18,313	0,384	0	0,384	1,00000000				
Repetição na placa	Exsudato	33,2616 33,2679	33,265	0,00	26,3604 25,8159	26,088	0,39	7,177	0,272	-1,239	0,272	2,29529924	2,02774313 1,82523357			
	Metanol	33,4766 33,3739	33,425	0,07	25,041 24,9785	25,010	0,04	8,416	0,060	0	0,060	1,00000000				

**Tabela O** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com naringenina por 48 h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Naringenina	35,2255 34,9399 34,9944	35,053	0,15	19,9069 19,7125 19,6884	19,769	0,120	15,284	0,137	-0,835	0,137	1,75081039	1,59749850 1,91883561	1,45538975	0,472916 235	32,49412 99
	Metanol	35,2226 35,5124 35,5066	35,414	0,17	19,3539 19,2788 19,2515	19,295	0,053	16,119	0,123	0	0,123	1,00000000	0,92082184 1,08598641			
2	Naringenina	34,61 34,8489 35,0768	34,845	0,23	17,5198 17,6622 17,4203	17,534	0,122	17,311	0,186	0,235	0,186	0,85430444	0,75406537 0,96786844			
	Metanol	34,6083 34,2695 34,6133	34,497	0,20	17,4717 17,4342 17,3562	17,421	0,059	17,076	0,145	0	0,145	1,00000000	0,90706618 1,10245539			
3	Naringenina	35,4991 35,3742 35,4092	35,428	0,06	17,1125 17,0143 16,9705	17,032	0,073	18,395	0,069	-0,667	0,069	1,56362659	1,49322161 1,63735114			
	Metanol	36,1732 36,0134 36,0144	36,067	0,09	17,0286 16,9970 16,9906	17,005	0,020	19,062	0,067	0	0,067	1,00000000	0,95631325 1,04568247			
Repetição na placa	Naringenina	33,5772 34,2352	33,906	0,47	25,1136 25,1049	25,109	0,01	8,797	0,329	-0,749	0,329	1,65281757	1,58061135 1,04568247			
	Metanol	33,7975 35,4413	34,619	1,16	24,9619 25,1845	25,073	0,16	9,546	0,829	0	0,829	1,00000000	1,00000000 1,00000000			

**Tabela P** – Expressão gênica relativa do gene *nodG* de *R. tropici* PRF81, submetido ao tratamento de indução com exsudato de sementes de feijão por 48h, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Rep. Biológica	Amostra/Trat	Ct <i>nodG</i>	Média Ct <i>nodG</i>	SD <i>nodG</i>	Ct rRNA 16S	Média Ct rRNA 16S	SD rRNA 16S	delta Ct	SD delta Ct	delta delta Ct	SD delta delta Ct	RQ	RQmín/RQmáx	RQ Geral	SD Geral	CV%
1	Exsudato	34,4648 35,0638 34,7694	34,766	0,30	19,8351 19,8990 19,7391	19,824	0,080	14,942	0,219	-0,535	0,219	1,43131610	1,23555509 1,65809343	1,40486374	0,199320 37	14,18787 916
	Água	35,3142 34,6997 34,8971	34,970	0,31	19,5031 19,4769 19,5021	19,494	0,015	15,476	0,222	0	0,222	1,00000000	0,86161928 1,16060541			
2	Exsudato	34,4909 34,1227 34,4278	34,347	0,20	17,1267 16,9313 17,0706	17,043	0,101	17,304	0,156	-0,691	0,156	1,58963709	1,43138897 1,76538044			
	Água	34,959 35,1537 34,7252	34,946	0,21	16,9271 17,0308 16,8938	16,951	0,071	17,995	0,160	0	0,160	1,00000000	0,89831367 1,11319691			
3	Exsudato	35,8881 35,5554 35,5769	35,673	0,19	16,4280 16,4624 16,3681	16,420	0,048	19,254	0,136	-0,264	0,136	1,19363803	1,08965138 1,30754824			
	Água	35,6511 36,3828 36,0495	36,028	0,37	16,5552 16,4597 16,5148	16,510	0,048	19,518	0,261	0	0,261	1,00000000	0,83928696 1,19148760			