

A Formação do Nódulo em Leguminosas





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-8498
Junho/2008*

Documentos 251

A Formação do Nódulo em Leguminosas

Leandro Azevedo Santos
Veronica Massena Reis

*Seropédica – RJ
2008*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Bruno José Rodrigues Alves e Helvécio De-Polli

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2008): 50 exemplares

S237f Santos, Leandro Azevedo

A formação do nódulo em leguminosas / Veronica Massena Reis.
Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 14 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 251)

1. Leguminosa. 2. Nódulo. I. Reis, V. M., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 583.74

Autores

Leandro Azevedo Santos

Eng^o Agrônomo, Doutorando em Ciência do Solo, Professor Substituto da UFRRJ, disciplina de Fisiologia Vegetal
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

Veronica Massena Reis

Eng^a Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa (2008-2011), desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 251 intitulada “A formação de nódulo em Leguminosas” fornece informações atuais sobre o surgimento desta estrutura conhecida como “nódulo” que se forma quase que exclusivamente nas raízes das plantas da família das leguminosas. Na relação microssimbionte e planta hospedeira processos bioquímicos e sinais moleculares são trocados entre as partes, o conhecimento destas complexas inter-relações, são fundamentais para que cada vez mais seja possível ampliar a eficiência das relações simbióticas voltadas para fixação biológica de nitrogênio. A presente publicação destina-se a pesquisadores, técnicos e estudantes de pós-graduação interessados em conhecer como se dá a formação dos nódulos e fatores biológicos que levam ao aparecimento desta estrutura, que são verdadeiras “mini-fábricas” de produção de nitrogênio, a partir da infecção por bactérias do tipo rizóbio.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

Introdução.....	7
Flavonóides e Genes <i>nod</i>	9
Exopolissacarídeos	13
Início da Infecção	14
O Plasmídeo Simbiótico	16
“Quorum-sensing”	17
Considerações finais	20
Referências Bibliográficas	21

A Formação do Nódulo em Leguminosas

Leandro Azevedo Santos
Veronica Massena Reis

Introdução

Uma interação complexa e específica entre as bactérias do solo pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phylorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, comumente conhecidos como rizóbios, e suas plantas hospedeiras resultam no desenvolvimento de nódulos radiculares. Nódulos são novos órgãos que consistem principalmente de células infectadas das plantas com bacteróides que provocam a fixação do nitrogênio. Dentro dos nódulos, as bactérias assumem uma forma endo-simbiótica, os bacteróides, que são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia (BROUGHTON et al., 2006). Como a amônia é tóxica para a planta, ela é rapidamente convertida a amidas e/ou ureídos, que nutrem a planta hospedeira.

A iniciação da formação dos nódulos é controlada em vários níveis: as raízes das plantas excretam vários flavonóides, alguns dos quais necessários para ativar a expressão de genes reguladores da nodulação, particularmente as proteínas NodD (PERRET et al., 2000). O complexo NodD-flavonoides interage com uma região promotora conservada (*nod* boxes) que está localizada após da maioria dos genes *nod* no genoma da bactéria. A transcrição acontece e o produto enzimático dos genes *nod* leva a síntese e secreção de fatores Nod (lipo-quito-oligossacarídeos) (BROUGHTON et al., 2006). Um controle fino da transcrição dos genes *nod* está provavelmente relacionado à variações na seqüência das regiões conservadas nos promotores *nod*, individualmente (FREIBERG et al., 1997). Outros produtos do rizóbio são necessários para continuidade do desenvolvimento do cordão de infecção, e estes representam um terceiro conjunto de sinais.

Embora seja claro que os fatores Nod permitem ao rizóbio penetrar nas raízes das leguminosas, outros carboidratos bem como proteínas são necessários para o desenvolvimento do cordão de infecção e as subseqüentes etapas da formação do nódulo. Entre estes, acredita-se que os polissacarídeos da superfície celular do rizóbio estejam envolvidos na iniciação do cordão de infecção, invasão do nódulo, e

especificidade hospedeira (BROUGHTON et al., 2006). Segundo este mesmo autor, infelizmente existem poucos dados disponíveis sobre os componentes da superfície celular e também sobre como as mudanças na superfície celular são reguladas durante a infecção. Células cultivadas de *Rhizobium* e espécies correlatas produzem duas formas de lipopolissacarídeos (LPS): LPS rugoso (R-LPS), que consiste em um lipídeo “A” ancorado na membrana e ligado a um oligossacarídeo central, e LPS liso (S-LPS), que inclui um antígeno “O” (REUHS et al., 1998). Ao contrário, antígeno “K” não tem o lipídeo ancorado na membrana e são estruturalmente distintos dos LPS. Ambos os tipos de polissacarídeos na superfície celular podem ser separados (baseado na presença do lipídeo hidrofílico “A” sobre o LPS) e identificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida com revelação diferencial (KIM et al., 1996).

A expressão de antígenos na superfície celular é modulada pela simbiose, e vários polissacarídeos são pelo menos parcialmente modificados durante a transição das células em vida livre e nos bacteróides (FRAYSSE et al., 2002; KANNENBERG & CARLSON, 2001). NOEL et al. (1996), mostraram que tanto o extrato de sementes como de raízes de *Phaseolus vulgaris* podem provocar modificações estruturais nos LPS de *Rhizobium etli*.

Embora provas bioquímicas devam ainda ser obtidas, é amplamente aceito que os fatores Nod são percebidos por quinases tipo-receptor que contém domínios ligados a açúcares LysM (MIDDLETON et al., 2007). Tais quinases tipo-receptores existem como uma família de genes com pelo menos três membros, NFP, LYK3, e LYK4 (BEN AMOR et al., 2003; LIMPENS et al., 2003; ARRIGHI et al., 2007) em *Medicago truncatula*, e dois membros, NFR1 e NFR5 (RADUTOIU et al., 2003) em *Lotus japonicus*. Para estes mesmos autores, mutantes nos alelos de vários prováveis receptores mostraram baixa ou nenhuma resposta aos fatores Nod, suportando a hipótese que eles participam na percepção dos fatores Nod.

A subsequente rota de transdução de sinal requer outros receptores quinases (DMI2 em *Medicago*, SymRK em *Lotus*) e um provável canal de cálcio (DMI1 em *Medicago*) (ENDRE et al., 2002; STRACKE et al., 2002; ANE et al., 2004). Em *Medicago* estas proteínas são essenciais para induzir o transporte de Ca^{+2} na região perinuclear dos pêlos radiculares em apenas um minuto após a aplicação do fator Nod

(WAIS et al., 2000). Esta entrada de cálcio provavelmente ativa proteínas quinases (DMI3 em *Mendicago*) dependentes de cálcio e calmodulina que também é necessário para sinalização pelo fator Nod (LEVY et al., 2004).

Em trabalho realizado por SMIT et al. (2005) com *Mendicago*, é mostrado que o DMI3 é localizado no núcleo das células da epiderme da raiz tanto nas raízes inoculadas como nas não inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* Sm2011, sugerindo que a ativação do DMI3 e a subsequente rota de transdução de sinal do fator Nod ocorre no núcleo. Assim, os autores propõem que o alvo do DMI3 é primariamente um fator de transcrição que controla a expressão de genes induzidos pelo fator Nod. Além disto, é também proposto que este fator de transcrição seja constitutivamente presente numa forma inativa, e deve ser ativado pela sinalização do fator Nod, e também deve ser essencial para todas mudanças de expressão gênica induzidas por fatores Nod.

Recentemente, foi descoberto um gene que atua no estágio inicial da interação *Rhizobium*-leguminosa (ENOD40), e se mostrou crucial no processo de infecção da planta pela bactéria e também na organogênese do nódulo, onde a inibição deste gene por RNAi levou a uma significativa supressão da formação do nódulo em *Lotus japonicum* (KUMAGAI et al., 2006).

Flavonóides e Genes *nod*

As plantas liberam uma grande quantidade de compostos orgânicos nos solos, onde a maioria deles é responsável pelo desenvolvimento de microorganismos na rizosfera. Estudos com marcação do CO₂ com ¹⁴C mostraram que 19% dos fotossintatos são liberados como compostos orgânicos na rizosfera (HELAL & SAUERBECK, 1989). Entre estes compostos são encontrados carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos e derivados fenólicos e dentre estes, os flavonóides (derivados do 2-phenyl-1,4-benzopirone) são os mais importantes no que se refere ao aspecto simbiótico. Embora encontrados ao longo de todo reino vegetal, os flavonóides são moléculas capazes de induzir a expressão de genes do rizóbio necessários para o processo de nodulação (*nod*, *nol*, e *noe*). A capacidade de indução pode variar com o flavonóide e o rizóbio, e em alguns casos os flavonóides podem também inibir a indução

(PHILLIPS & KAPULNIK, 1995). Outras moléculas como as betainas e os ácidos eritronicos e tetronicos podem também atuar como indutores (OVTSYNA et al., 1999).

A regulação da expressão do gene *nod* varia de estirpe para estirpe, mas é quase sempre mediada pelo NodD. A proteína NodD pertence a uma família de reguladores transcricionais (LysR-like) que se ligam a um motivo de 47 pares de bases altamente conservado no DNA (*nod* boxes) encontrados nas regiões promotoras de muitos loci para nodulação (FISHER et al., 1988). Embora as proteínas Nod se liguem aos promotores *nod* mesmo na ausência dos indutores, os flavonóides são geralmente requeridos para a expressão dos genes *nod* (FISHER & LONG, 1993). Assim, NodD atua tanto como um sensor do sinal emitido pela planta, como um ativador transcricional de genes *nod*.

Apesar dos genes *nod* sejam constitutivos em rizóbio, suas características simbióticas variam de uma espécie para outra. Algumas estirpes como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tem somente um gene *nodD*, e nestes casos, sua mutação produz uma estirpe incapaz de nodular (Nod⁻). Por outro lado, *B. japonicum*, *Rhizobium* sp. estirpe NGR234, *R. meliloti* e *R. tropici* possuem duas a cinco cópias de *NodD* (FELLAY et al., 1995). Em *R. meliloti*, a mutação de todas as três copias de *NodD* são requeridas para impedir a nodulação (HONMA et al., 1990), enquanto a inativação do *nodD1* é suficiente para impedir a nodulação na estirpe NGR234 Nod⁻ (RELIC et al., 1993). Os produtos de várias espécies de *Rhizobium* variam quanto à resposta a diferentes grupos de flavonóides. Além disso, NodD homólogos de uma mesma estirpe possuem diferentes preferências por falvonóides (PHILLIPS et al., 1992).

Embora exista um número de correlações entre o espectro de flavonóides capazes de interagir com as proteínas NodD e uma ampla faixa de hospedeiros, variações na habilidade destas proteínas em perceber diferencialmente moléculas indutoras e regular a expressão dos genes *nod* são insuficientes para explicar o fenômeno da especificidade hospedeira (PERRET et al., 2000).

Os genes *NodD* representam uma interface molecular entre a bactéria e a planta (PERRET et al., 2000). Outros sistemas sensor-ativador espécie-específico, também contribuem para o controle da faixa de hospedeiros da bactéria. Por exemplo, *nodV* e *nodW* de *B. japonicum*

são essenciais para a nodulação de *Mendicago atropurpureum*, *Vigna radiata*, e *V. unguiculata*, mas contribuem somente marginalmente para a simbiose com *Glicine max* (GÖTTFERT et al., 1990). A modulação dos dois componentes do sistema regulatório como *NodV* e *NodW* por uma série de etapas de fosforilação, onde o *NodV* é uma proteína ligada a membrana que percebe o sinal da planta e transmite o sinal para o *NodW*, que em seqüência ativa a expressão dos genes *nod* (PERRET et al., 2000).

As recentes clonagens dos genes que codificam para os fatores de nodulação (NFs) têm promovido novos entendimentos sobre os mecanismos pelos quais os NFs são percebidos e disparam as subseqüentes etapas da cascata de transdução de sinais (GEURTS et al., 2005).

Duas metodologias independentes têm sido usadas para identificar prováveis receptores dos fatores de nodulação. A primeira metodologia foi a de pesquisar plantas mutantes que não respondem aos fatores Nod (NFs) devido a uma mutação no gene que codifica para um receptor do NF que é requerido para que o processo de nodulação aconteça. Além de tal NF “receptor de sinal”, tem sido proposto que um segundo tipo de receptor NF atue mais adiante na interação e no início da infecção (ARDOUREL et al., 1994). Leguminosas mutantes que perderam todas as respostas aos NF foram identificadas em ervilha, *Lotus japonicum*, e *Mendicago trunculata*. Em *L. japonicum*, dois loci (LjNFR1 e LjNFR5) foram identificados, enquanto em ervilha (PsSYM10) e *M. trunculata* (MtNFP) somente um único locus foi encontrado (MADSEN et al., 2003; RADUTOIU et al., 2003). LjNFR5, PsSYM10 e provavelmente MtNFP são ortólogos e codificam receptores quinases LysM (LysMRKs). Segundo estes mesmos autores, as seqüências destes LysM-RKs sugerem que eles devam ser localizados membrana plasmática. Estes LysM-RKs são portanto bons candidatos a ligação dos NFs, que contém uma coluna de N-acetilglucosamina, mas a ligação direta dos NFs devem ser ainda demonstrada (GEURTS et al., 2005).

A expressão dos genes *nod* é também sujeito a um controle negativo. Depois da indução pelos flavonóides, a repressão de vários genes é requerida para uma ótima nodulação de *M. sativa* por *R. melioli* e de *P. sativum* por *R. leguminosarum* bv. *viciae* estirpe Tom (KISS et al., 1998). Em *R. melioli*, a repressão de vários genes *nod* é controlada

pela NolR, um produto de 35kDa que contém um motivo hélice-volta-hélice que é homólogo a outros reguladores da família LysR como o NodD e SyrM (KONDOROSI et al., 1991). Na sua forma dimérica, NolR liga-se a região conservada (A/T)TTAGN₉A(T/A) e assim reprime a expressão dos genes *nodD*, bem como daqueles necessários para a síntese da estrutura central dos fatores Nod (*nodABC*).

Mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* (*nolA*) e *Rhizobium melioli* (*nolR*) perdem a habilidade de nodular suas respectivas hospedeiras, embora em baixa eficiência, sugerindo que um controle fino da expressão dos genes é requerido para uma ótima nodulação (PERRET et al., 2000). Um mutante *nodD2* da estirpe NGR234 fracassa em reprimir a expressão do operon *nodABCInolOnoel* depois da indução inicial por flavonóides, e ao contrario da estirpe selvagem, é incapaz de formar nódulos que fixem nitrogênio em *Vigna unguiculata* e *Cajanus cajan* (FELLAY et al., 1998).

Um esquema ilustrativo da interação simbiótica (troca de sinais entre a planta e a bactéria) pode ser mostrado na Figura 1 (BROUGHTON et al., 2003).

Flavonóides excretados pelas raízes ativam a expressão de genes do rizóbio requeridos para o processo de nodulação (*nod*, *nol*, e *noe*). A regulação destes genes é mediada pelo regulador transcricional NodDI. Muitos genes da nodulação estão envolvidos na síntese de uma família de sinalizadores chamados, fatores Nod. Em NGR234, NodDI também controla o *y4xI* que regula a expressão de genes que codificam para componentes de um tipo III de sistema de secreção da bactéria (TTSS). Secreção de proteínas externas de nodulação (Nop) pelo TTSS afeta a habilidade do NGR234 para nodular várias plantas hospedeiras (Figura 1A).

O centro do fator Nod é sintetizado pelo NodC (uma N-acetil glucosaminiltransferase requerida para o alongamento da cadeia), Nod B (uma deacetilase que remove o grupo N-acetil em uma terminação não redutora), e NodA (uma aciltransferase que liga a cadeia acil no oligosacarídeo deacetilado). A síntese dos fatores Nod de NGR234 requer também outros genes da nodulação, como: *NodS* (envolvido em N-metilações), *NodU* (carbamilação), e *Nod Z* (fucozilação) (BROUGHTON et al., 2003) (Figura 1 B).

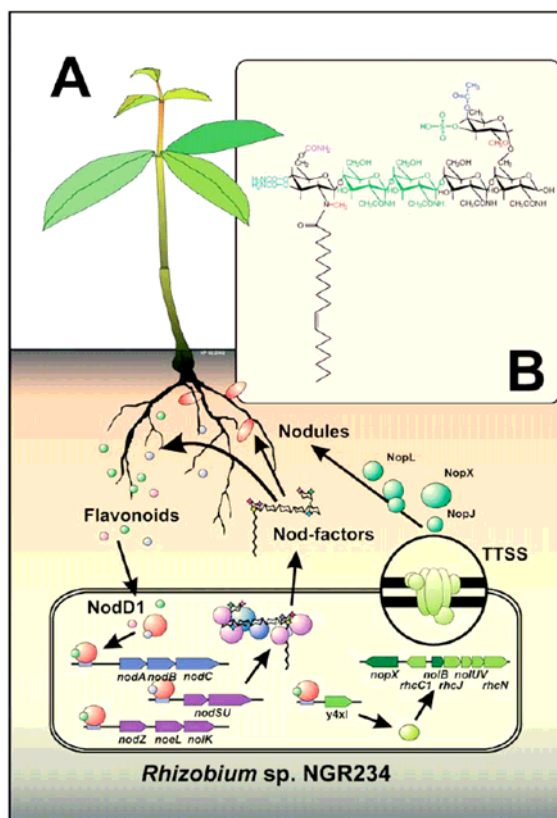


Figura 1. Fatores determinantes da nodulação em *Rhizobium* sp. NGR234 induzidos por flavonóides. (A) Flavonóides excretados pelas raízes ativam a expressão de genes do rizóbio requeridos para o processo de nodulação (nod, nol, e noe). (B) Fatores Nod são lipo-quito-oligosacarídeos modificados como os β -1,4-oligomeros conectatos de N-acetil-D-glucosamina, com um ácido graxo substituindo o grupo N-acetil em suas terminações não redutoras (BROUGHTON et al., 2003).

Exopolissacarídeos

O desenvolvimento do nódulo propriamente, requer a síntese e percepção de sinais moleculares como lipo-quito-oligosacarídeos chamados de fatores Nod que são importantes para indução do desenvolvimento dos nódulos. A superfície de polissacarídeos da bactéria é também crucial para o sucesso do estabelecimento da simbiose com as leguminosas. Os polímeros de açúcares dos rizóbios são compostos de um número de diferentes polissacarídeos, como lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS ou antígenos-K), β -1,2-glucans neutro e polissacarídeos extracelulares ácidos (EPS). Estas moléculas são utilizadas no reconhecimento com o hospedeiro e várias foram descritas na literatura.

Entre os genes de rizóbio requeridos para iniciação e alongamento do cordão de infecção, os genes responsáveis pela produção de diferentes tipos de polissacarídeos na superfície celular têm um papel

muito importante. A superfície de polissacarídeos que forma uma camada coesiva e aderente na superfície celular são chamados de polissacarídeos capsulares (CPS), enquanto o termo exopolissacarídeo (EPS) é usado para polissacarídeos com pouca ou nenhuma associação com as células (BECKER & PÜHLER, 1998). Os β -1,2-glucans cíclicos são geralmente concentrados no espaço periplasmático do rizóbio, onde desempenham uma função importante na adaptação osmótica da bactéria (BREEDVELD et al., 1993). Lipopolissacarídeos (LPS) são ancorados na superfície externa da membrana e são constituídos por lipídeos A, um oligossacarídeo central e um polissacarídeo antígeno-O.

Genes relacionados a biosíntese de exopolissacarídeos (exo/exs ou pss) formam um grande grupo de genes localizados tanto no cromossomo quanto nos megaplasmídeos (FINAN et al., 2001). Entre as proteínas codificadas dentro de tais regiões podem ser citadas: as transferases, responsáveis pela montagem das unidades repetidas do EPS, as enzimas envolvidas na biosíntese de precursores de nucleotídeos e açúcares, as enzimas envolvidas na modificação dos EPS com ramificações não derivadas de açúcares, e proteínas envolvidas na polimerização e exportação de cadeias de EPS sobre a superfície celular (REUBER & WALKER, 1993; WHITFIELD & PAIMENT, 2003).

Início da Infecção

Depois da exsudação e quimiotaxia, inicia-se o processo de colonização que começa com a adesão do rizóbio ao pêlo radicular. Os rizóbios são capazes de se ligar aos pêlos radiculares do hospedeiro. Em *Rhizobium leguminosarum* esta ligação consiste de duas etapas. A primeira é uma ligação fraca ao pêlo radicular Ca^{+2} -dependente que é mediada por uma proteína chamada ricadesina, que é pensado estar presente na maioria dos rizóbios (SMIT et al., 1989). A proteína ricadesina tem sido purificada de *R. leguminosarum*, mas seu gene não foi clonado ou mesmo identificado. No entanto, uma proteína, RapA1, de *R. leguminosarum* bv. trifolli, que tem muitas propriedades semelhantes com a ricadesina, já foi descrita (AUSMEES et al., 2001).

Seguindo esta etapa de ligação fraca, uma etapa de ligação forte é iniciada pela síntese de celulose e fibrilas pela bactéria. A síntese

dessas fibrilas foi mostrada como sendo requerida para *R. leguminosarum* formar um tipo de biofilme na ponta de raízes de ervilha. Mutantes que não formam as fibrilas não formam o biofilme, mas são capazes de formar nódulos que fixam nitrogênio, indicando que a formação deste tipo-biofilme mediado por celulose não é absolutamente requerida para que ocorra sucesso na simbiose (SMIT et al., 1989). Contudo, a ligação e o envolvimento devem ser necessários para uma eficiente colonização dos pêlos radiculares em condições naturais, onde a competição pela superfície radicular é intensa (GAGE, 2004).

Lecitinas produzidas pelas plantas hospedeiras também tem sido mostrado ter função na adesão do rizóbio à planta que formam nódulos determinados e indeterminados. Estas lecitinas localizam-se nas pontas dos pêlos radiculares e acredita-se que podem ajudar na especificidade da comunicação entre hospedeiro e simbiote através de uma ligação simultânea à parede celular da planta e a sacarídeos na superfície da bactéria compatível (HIRSCH, 1999).

Alfafa transgênica que expressa lecitina de ervilha forma nódulos e cordão de infecção quando inoculada com baixo número de *R. leguminosarum* bv. *Viciae*, que sintetiza fator Nod de *Sinorhizobium melioli*. Plantas controle e transgênica que expressam uma lecitina mutante de ervilha não formam nódulos ou cordão de infecção quando inoculados com baixo número da mesma estirpe (VAN RHIJN et al., 2001).

Depois da adesão do rizóbio ao pêlo radicular inicia-se a deformação e enrolamento do mesmo. Os pêlos radiculares das plantas hospedeiras deformam-se sobre a influencia dos fatores Nod purificados de espécies compatíveis de rizóbio. Este fenômeno tem sido estudado em detalhes em muitas espécies de plantas, como alfafa, *M. truncatula*, ervilha, trevo, e outras. Tem sido mostrado que um subconjunto de pêlos radiculares é suscetível a deformação induzidas pelos fatores Nod (SIEBERER & EMONS, 2000). Os mais suscetíveis pêlos radiculares são aqueles que têm crescimento quase terminado (pêlos radiculares zona II). Pêlos radiculares que tem crescimento terminado (pêlos radiculares zona III) e pêlos radiculares que estão crescendo ativamente com uma forte organização interna (pêlos radiculares zona I) são refratários a deformação na presença de fatores Nod (Figura 2) (GAGE, 2004).

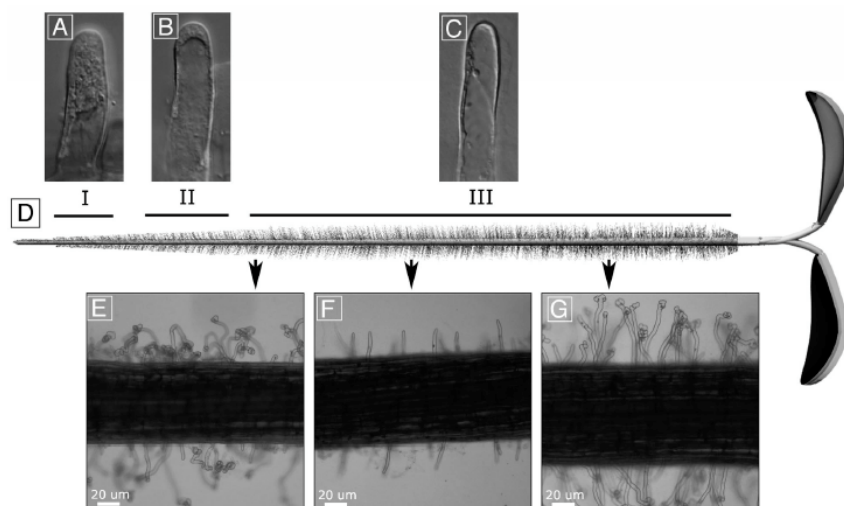


Figura 2. Morfologia de pelos radiculares de raízes inoculadas e não inoculadas. (A-C) Pêlos radiculares típicos das zonas I, II e III respectivamente, de uma planta de alfafa não inoculada. (D) Diagrama de uma plântula de alfafa mostrando a localização dos pelos radiculares da zona I, II e III. (E-G) Fotografias mostrando como a resposta dos pelos radiculares de *Sinorhizobium melioli* podem variar ao longo do comprimento de uma única raiz. As três imagens foram tiradas de uma única plântula inoculada na localização indicada no diagrama central (GAGE, 2004).

A degradação da parede celular dos pêlos radiculares no local de iniciação do cordão de infecção e a subsequente aproximação da bactéria em direção a membrana subjacente tem sido claramente demonstrado em um grande número de casos, embora a questão de qual parceiro, planta ou bactéria, é responsável pela degradação permaneça aberta (GAGE, 2004). Após a iniciação da formação do cordão de infecção, o mecanismo de extensão deste, é provavelmente o mesmo requerido para extensão do pêlo radicular. Durante o crescimento do cordão de infecção ao longo do pêlo radicular, existe uma associação entre a ponta de alongamento do cordão de infecção e o núcleo do pêlo radicular, tanto que existe uma conexão entre a ponta e o núcleo do pêlo radicular durante o seu crescimento (GAGE, 2004).

O Plasmídeo Simbiótico

Em diferentes espécies de *Rhizobium*, muitos genes envolvidos com a nodulação, fixação de nitrogênio e biosíntese de polissacarídeos estão presentes em um ou mais megaplasmídeos conhecidos como plasmídeos simbióticos (Sym). Por outro lado, as espécies de *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, e *Mesorhizobium* levam muitas das informações relacionadas ao processo simbiótico em agrupamentos

ou “ilhas” isoladas no cromossomo (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003). Algumas evidências sugerem que estes locais de *Messorhizobium loti* podem ser transferidos horizontalmente por conjugação de uma estirpe fixadora de nitrogênio para outra não simbiótica (SULLIVAN & RONSON, 1998).

Em *S. melilotii*, existem duas classes de plasmídeos, megaplasmídeos e plasmídeos pRme. *S. melilotii* tipicamente contém dois megaplasmídios de aproximadamente 1,4 e 1,7Mb, chamados pSyma e pSymB, respectivamente. pSymA leva genes para fixação de nitrogênio (*nif*) e para nodulação (*nod*), enquanto os genes envolvidos na produção de exopolissacarídeos essenciais para a simbiose (*exo* e *exp*), biossíntese de tiamina (*thi*), e transporte de ácido dicarboxílico (*dct*) são encontrados no pSymB (BARLOY-HUBLER et al., 2000). pSymA e pSymB são mantidos transmissíveis e estáveis em novos hospedeiros como *A. tumefaciens*. Por outro lado, pRme cujo número varia amplamente entre as cepas não parece ser essencial para nodulação e fixação de nitrogênio. Não é claro quais funções contêm nestes plasmídios, mas muitos deles contêm regiões com extensiva homologia a do plasmídio Ti de *A. tumefaciens* (BANFALVI et al., 1985). Muitos destes plasmídeos aparentam ser auto-transmissíveis, e poderia estar envolvido não somente na sua própria transferência, mas também na mediação da transferência em baixa frequência de megaplasmídeos simbióticos (BANFALVI et al., 1985).

“Quorum-sensing”

A população de bactérias regula coordenadamente a expressão de genes pela produção de sinais moleculares difusos. Estes sinais conhecidos como autoindutores, se acumulam extracelularmente e interagem especificamente com uma proteína receptora para afetar mudanças não relacionadas ao seu próprio metabolismo (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003). A produção de autoindutores ocorre em estágios específicos do crescimento ou em resposta a mudanças no ambiente e induz a uma resposta concentrada quando uma concentração crítica é alcançada. Estes sinais difusos frequentemente atuam para induzir a expressão de genes em resposta à densidade de células num processo frequentemente referido como “quorum-sensing” (WITHERS et al., 2001). O mais caracterizado mecanismo de “quorum-sensing” é encontrado em bactérias Gram-negativas e envolve o uso de lactonas homocerinas aciladas (AHLs – acylated

homoserine lactones) como moléculas sinais (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003). Segundo esse mesmo autor, o “quorum sensing” tem um papel muito importante em preparar e mesmo coordenar a simbiose com o rizóbio na fixação de nitrogênio durante o estabelecimento de suas interações com a planta hospedeira.

Um dos mais bem estudados mecanismos de “quorum-sensing” é o de *Photobacterium fischeri* (antigo *Vibrio fischeri*), uma bactéria marinha que é um simbiote de vários peixes marinhos e lulas (VISICK & MCFALL-NGAI, 2000). Neste organismo modelo, o nível basal de síntese de autoindutores ocorre em baixa densidade de células, como aquelas encontradas na água do mar. Os autoindutores, que pertencem à família dos AHL de sinais moleculares, podem passar através das células por difusão. Como a densidade de células aumenta durante a associação simbiótica com o animal hospedeiro, os autoindutores acumulam dentro e em volta das células. Quando um nível crítico de AHLs (por volta de 10 nM) é alcançado, o regulador LuxR é ativado pela ligação em AHL (KAPLAN et al., 1985). LuxR, um ativador transcricional, então induz a expressão do operon *lux* (Figura 3) (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

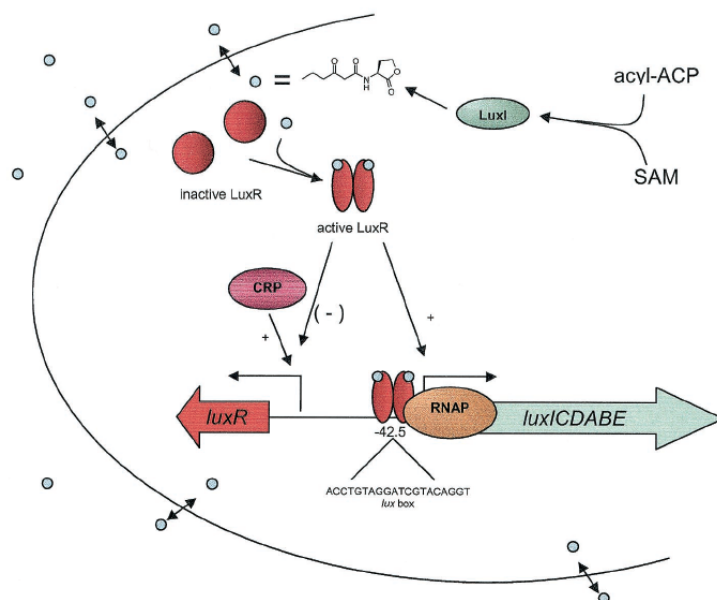


Figura 3. Modelo de quorum-sensing em *P. fischeri*. Em baixa densidade de células a transcrição do operon *luxICDABE* ocorre em nível basal. *LuxI* codifica para AHL sintase, que sintetiza o 3-oxo-c6-HSL dos substratos acil-ACP e SAM. Alta densidade de células leva a acumulação de AHLs, que liga-se e ativa o ativador transcricional *LuxR*. *LuxR* liga-se a uma repetição invertida do promotor *lux* que está localizado na posição -42.5 do início da transcrição, e ao interagir com o complexo da RNA polimerase estimula a expressão dos genes *luxICDABE*. A expressão do gene *LuxR* é regulada por vários fatores como choque térmico, repressão do catabolismo, ou mesmo por *LuxR* (somente em densidade de células extremamente elevada) (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

O operon *lux* contém o *luxI* (AHL sintase) junto com o gene necessário para luminescência. A ativação do operon *lux* leva a um rápido aumento nos níveis de autoindutores e cria feedback positivo que é seguido por um começo de luminescência. LuxR é regulado a nível transcricional pela proteína receptora de AMP cíclico e presumivelmente a nível pós-transcricional por GroEL (DOLAN & GREENBERG, 1992). Em baixos níveis de AHL, LuxR ativa sua própria expressão, enquanto que em altos níveis de AHL, a proteína LuxR ativa reprime a si mesma (SHADEL & BALDWIN, 1992).

A transferência conjugal do plasmídeo Ti por *Agrobacterium tumefaciens* é também regulado em parte por quorum-sensing. O plasmídeo Ti leva alguns reguladores chave do “quorum-sensing”, como: *traI* (um homólogo do *luxI*), *traR* (homólogo do *luxR*), e *traM* (um inativador da TraR) (FUGUA et al., 1995; HWANG et al., 1994). *TraI* sintetiza um AHL, 3-oxo-C₈-homoserina lactona (3-oxo-C₈-HSL), que liga-se e ativa o TraR. A TraR então vai ativar seus alvos: *traAFB*, *traCDG*, e *traI-trb*. Quando os níveis de TraR são baixos, TraM liga-se a este e forma um complexo inativo, dessa forma evitando a transferência do plasmídeo, até que a densidade de células se torne elevada (SWIDERSKA et al., 2001).

A relação simbiótica formada entre os rizóbios fixadores de nitrogênio e suas leguminosas hospedeiras é o resultado de uma intrincada rede de sinais trocados entre eles. Muitos aspectos relacionados à troca de sinais permanecem ainda sem explicação, no entanto, evidências são claras de que “quorum-sensing” exerce um papel chave no processo simbiótico (DANIELS et al., 2002; LOH & STACEY, 2003; MARKETON et al., 2003).

Além dos bem caracterizados sinais moleculares (flavonóides, fatores Nod, e exopolissacarídeos) existem AHLs produzidos por “quorum-sensing” que têm sido relacionados a vários fenômenos como eficiência de nodulação, desenvolvimento do simbiossomo, produção de exopolissacarídeos, e fixação de nitrogênio, todos importantes para o estabelecimento e sucesso da simbiose (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

Dos rizóbios fixadores de nitrogênio, o “quorum-sensing” é mais bem caracterizado em *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Vários sistemas envolvendo “quorum-sensing” (*rai*, *rhi*, *cin*, e *tra*) têm sido identificados

e estão envolvidos numa complexa rede regulatória (WILKINSON et al., 2002; WISNIEWSKI-DYE et al., 2002). Este exemplo pode ser visto na Figura 4 (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

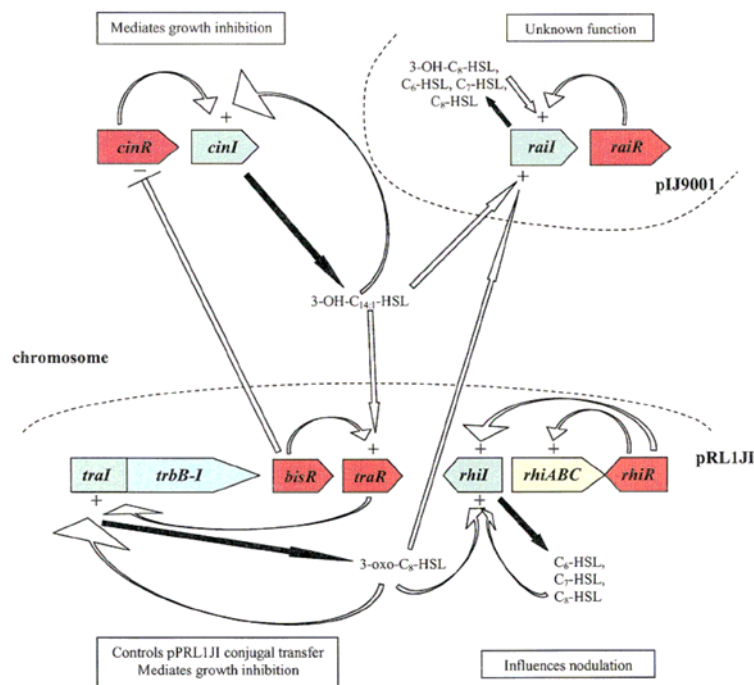


Figura 4. Rede quorum-sensing em *R. leguminosarum* bv. *viciae*. *R. leguminosarum* abriga quatro conhecidos sistemas “quorum-sensing”. O sistema cinRI reside sobre o cromossomo e produz 3-OH-C_{14:1}-HSL, que influencia positivamente os sistemas tra e rai. BisR apresenta uma função dual na ativação do traR e repressão do cinR em resposta ao 3-OH-C_{14:1}-HSL, assim, ligando os sistemas cin e tra. pRL1JI abriga os sistemas tra e rhi, assim como os genes que conferem sensibilidade ao crescimento em resposta ao 3-OH-C_{14:1}-HSL. O sistema tra é responsável pela produção do 3-oxo-C₈-HSL e controla a transferência do plasmídeo por conjugação, enquanto o sistema rhi produz várias cadeias curtas de AHLs e influencia a eficiência de nodulação por um mecanismo não conhecido. O locus raiRI reside no pLJ9001 e também produz várias cadeias curtas de AHLs; contudo, pouco é conhecido sobre a função destes sistemas “quorum-sensing” (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

Considerações finais

A pesquisa sobre a formação do nódulo tem demonstrado grande avanço e a descoberta dos flavonóides, fatores Nod, polissacarídeos de superfície e elementos de comunicação foram descritos, além da inclusão do “quorum-sensing”, proteínas de secreção do tipo I, II, III e IV, outras moléculas diferentes dos flavonóides e indutores dos genes nod e de crescimento do rizóbio. A descrição que o fator Nod está envolvido no “diálogo” molecular abriu caminho para a descoberta de que o rizóbio produz muito mais variante deste composto do que se

pensava anteriormente e que fatores do ambiente influenciam a síntese destas estruturas (MORÓN et al., 2005). Muito se tem a fazer, mas a base sólida da pesquisa sobre a formação dos nódulos revela a complexidade deste sistema que tem por objetivo transferir nitrogênio para o hospedeiro em troca de carboidratos.

Referências Bibliográficas

ANE, J. M.; KISS, G. B.; RIELY, B. K.; PENMETSA, R. V.; OLDROYD, G. E. D.; AYAX, C.; LEVY, J.; DEBELLE, F.; BAEK, J. M.; KALO, P.; ROSENBERG, C.; ROE, B. A.; LONG, S. R.; DENARIE, J.; COOK, D. R. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. **Science**, Madison, v. 303, n. 5662, p. 1364-1367, feb. 2004.

ARDOUREL, M.; DEMONT, N.; DEBELLE, F. D.; MAILLET, F.; DE BILLY F.; PROMÉ, J. C.; DENARIE, J.; TRUCHET, G. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors - different structural requirements for bacterial entry into target root hair-cells and induction of plant symbiotic developmental responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 10, p.1357-1374, oct. 1994.

ARRIGHI, J. F.; BARRE, A.; BEN AMOR, B.; BERSOULT, A.; SORIANO, L. C.; MIRABELLA, R.; DE CARVALHO-NIEBEL, F.; JOURNET, E. P.; GHERARDI, M.; HUGUET, T.; GEURTS, R.; DENARIE, J.; ROUGE, P.; GOUGH, C. The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 2, p. 1078-1078, feb. 2007.

AUSMEES, N.; JACOBSSON, K.; LINDBERG, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Microbiology**, Reading, v. 147, Part 3, p. 549–559, mar. 2001.

BANFALVI, Z.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. **Plasmid**, San Diego, v. 13, n. 2, p. 129–138, 1985.

BARLOY-HUBLER, F.; CAPELA, D.; BATUT, J.; GALIBERT, F. High-resolution physical map of the pSymb megaplasmid and comparison of the three replicons of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Current Microbiology**, France, v. 41, n. 2, p. 109–113, aug. 2000.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.). **Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 97-118.

BEN AMOR, B.; SHAW, S. L.; OLDROYD, G. E. D.; MAILLET, F.; PENMETSA, R. V.; COOK, D.; LONG, S. R.; DENARIE, J.; GOUGH, C. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. **Plant Journal**, France, v. 34, n. 4, p. 495–506, may 2003.

BREEDVELD, M. W.; CREMERS, H. C. J. C.; BATLEY, M.; POSTHUMUS, M. A.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M.; WIJFFELMAN, C. A.; ZEHNDER, A. J. B. Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 3, p.750-757, feb. 1993.

BROUGHTON, W. J.; ZHANG F.; PERRET, X.; STAEHELIN, C. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 129–137, may 2003.

BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W. J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, may 2006.

DANIELS, R.; DE VOS, D. E.; DESAIR, J.; RAEDSCHELDERS, G.; LUYTEN, E.; ROSEMEYER, V.; VERRETH, C.; SCHOETERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. **Journal of Biology and Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 1, p. 462–468, jan. 2002.

DOLAN, K. M.; GREENBERG, E. P. Evidence that GroEL, not sigma 32, is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n.15, p.5132–5135, aug. 1992.

ENDRE, G.; KERESZT, A.; KEVEI, Z.; MIHACEA, S.; KALÓ, P.; KISS, G. B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 962-966, jun. 2002.

FELLAY, R.; PERRET, X.; VIPREY, V.; BROUGHTON, W. J.; BRENNER, S. Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 657–661, may 1995.

FELLAY, R.; HANIN, M.; MONTORZI, G.; FREY, J.; FREIBERG, C.; GOLINOWSKI, W.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J.; JABBOURI, S. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in repression of the *nodABC* operon. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 1039–1050, mar. 1998.

FINAN, T. M.; WEIDNER, S.; WONG, K.; BUHRMESTER, J.; CHAIN, P.; VORHOLTER, F. J.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; BECKER, A.; COWIE, A.; GOUZY, J.; GOLDING, B.; PÜHLER, A. The complete sequence of the 1, 683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 17, p. 9889-9894, aug. 2001.

FISHER, R. F.; EGELHOFF, T. T.; MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free-extracts containing NodD to DNA-sequences upstream of inducible nodulation genes. **Genes & Development**, New York, v. 2, n. 3, p. 282–293, mar. 1988.

FISHER, R. F.; LONG, S. R. Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 233, n. 3, p. 336–348, oct. 1993.

FRAYSSE, N.; JABBOURI, S.; TREILHOU, M.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides. **Glycobiology**, France, v. 12, n. 11, p. 741–748, nov. 2002.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, London, v. 387, n. 6631, p. 394–401, may 1997.

FUQUA, C.; BURBEA, M.; WINANS, S. C. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p.1367–1373, mar. 1995.

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

GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 346–352, aug. 2005.

GONZÁLEZ, J. E.; MARKETON, M. M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 574–592, dec. 2003.

GÖTTFERT, M.; GROB, P.; HENNECKE, H. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 7, p. 2680–2684, apr. 1990.

HELAL, H. M.; SAUERBECK, D. Carbon turnover in the rhizosphere. **Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde**, Weinheim, v. 152, n. 3, p. 211–216, jun. 1989.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, n. 4, p. 320–326, aug. 1999.

HONMA, M. A.; ASOMANING, M.; AUSUBEL, F. M. *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 2, p. 901–911, feb. 1990.

HWANG, I. Y.; LI, P. L.; ZHANG, L. H.; PIPER, K. R.; COOK, D. M.; TATE, M. E.; FARRAND, S. K. Tral, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 11, p. 4639–4643, may 1994.

KANNENBERG, E. L.; CARLSON, R. W. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. **Molecular Microbiology**, Oxon, v. 39, n. 2, p. 379–391, jan. 2001.

KAPLAN, H. B.; GREENBERG, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.163, n. 3, p.1210–1214, 1985.

KIM, J. S.; REUHS, B. L.; RAHMAN, M. M.; RIDLEY, B.; CARLSON, R. W. Separation of bacterial capsular and lipopolysaccharides by preparative electrophoresis. **Glycobiology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 433–437, jun. 1996.

KISS, E.; MERGAERT, P.; OLAH, B.; KERESZT, A.; STAEHELIN, C.; DAVIES, A. E.; DOWNIE, J. A.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 12, p. 1186–1195, dec. 1998.

KONDOROSI, E.; PIERRE, M.; CREN, M.; HAUMANN, U.; BUIRE, M.; HOFFMANN, B.; SCHELL, J.; KONDOROSI, A. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 222, n. 4, p. 885–896, dec. 1991.

KUMAGAI, H.; KINOSHITA, E.; RIDGE, R. W.; KOUCHI, H. RNAi Knock-Down of *ENOD40s* leads to significant suppression of nodule formation in *Lotus japonicus*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1102–1111, aug. 2006.

LEVY, J.; BRES, C.; GEURTS, R.; CHALHOUB, B.; KULIKOVA, O.; DUC, G.; JOURNET, E. P.; ANE, J. M.; LAUBER, E.; BISSELING, T.; DENARIE, J.; ROSENBERG, C.; DEBELLE, F. A Putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. **Science**, Madison, v. 303, n. 5662, p. 1361-1364, feb. 2004.

LIMPENS, E.; FRANKEN, C.; SMIT, P.; WILLEMSE, J.; BISSELING, T.; GEURTS, R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. **Science**, Madison, v. 302, n. 5645, p. 630–633, oct. 2003.

LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 10–17, jan. 2003.

MADSEN, E. B.; MADSEN, L. H.; RADUTOIU, S.; OLBRYT, M.; RAKWALSKA, M.; SZCZYGLOWSKI, K.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. **Nature**, London, v. 425, n. 6958, p. 637-640, oct. 2003.

MARKETON, M. M.; GLENN, S. A.; EBERHARD, A.; GONZÁLEZ, J. E. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 1, p. 325–331, jan. 2003.

MIDDLETON, P. H.; JAKAB, J.; PENMETSÁ, R. V.; STARKER, C. G.; DOLL, J.; KALO, P.; PRABHU, R.; MARSH, J. F.; MITRA, R. M.; KERESZT, A.; DUDAS, B.; VANDENBOSCH, K.; LONG, S. R.; COOK, D. R.; KISS, G. B.; OLDROYD, G. E. D. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 4, p. 1221–1234, apr. 2007.

MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ, M. E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; RODRIGUES-NAVARRO, D. N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 1029-1040, sep. 2005.

NOEL, K. D.; DUELLI, D. M.; TAO, H.; BREWIN, N. J. Antigenic change in the lipopolysaccharide of *Rhizobium etli* CFN42 induced by exudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 9, n. 3, p.180–186, apr. 1996.

OVTSYNA, A. O.; RADEMAKER, G. J.; ESSER, E.; WEINMAN, J.; ROLFE, B. G.; TIKHONOVICH, I. A.; LUGTENBERG, B. J. J.; THOMAS-OATES, J. E.; SPAINK, H. P. Comparison of characteristics of the *nodX* genes from various *Rhizobium leguminosarum* strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 12, n. 3, p. 252–258, mar. 1999.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 1, p. 180-201, mar. 2000.

PHILLIPS, D. A.; KAPULNIK, Y. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. **Trends in Microbiology**, London, v. 3, n. 2, p. 58–64, feb. 1995.

PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; MAXWELL, C. A. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1526–1531, aug. 1992.

RADUTOIU, S.; MADSEN, L. H.; MADSEN, E. B.; FELLE, H. H.; UMEHARA, Y.; GRONLUND, M.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. **Nature**, London, v. 425, n. 6958, p. 585–592, oct. 2003.

RELIC, B.; TALMONT, F.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKY, W.; PROME, J. C.; BROUGHTON, W. J. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, n. 6, p. 764–774, nov./dec. 1993.

REUBER, T. L.; WALKER, G. C. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 11, p. 3653-3655, jun. 1993.

REUHS, B. L.; GELLER, D. P.; KIM, J. S.; FOX, J. E.; KOLLI, V. S. K.; PUEPPKE, S. G. *Sinorhizobium fredii* and *S. meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K-antigens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4930–4938, dec. 1998.

SHADEL, G. S.; BALDWIN, T. O. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri luxR* gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and -dependent *luxR* transcription. **Journal of Biology and Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 11, p. 7696–7702, apr. 1992.

SIEBERER, B.; EMONS, A. M. C. Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. **Protoplasma**, Vienna, v. 214, n. 1-2, p. 118–127, 2000.

SMIT, G.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Ca^{+2} -dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 1, p. 569–572, jan. 1989.

SMIT, P.; RAEDTS, J.; PORTYANKO, V.; DEBELLÉ, F.; GOUGH, C.; BISSELING, T.; GEURTS, R. NSP1 of the GRAS protein family is essential for Rhizobial Nod factor–induced transcription. **Science**, Madison, v. 308, n. 5729, p. 1789–1791, jun. 2005.

STRACKE, S.; KISTNER, C.; YOSHIDA, S.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SZCSYGLOWSKI, K.; PARNISKE, M. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 959–962, jun. 2002.

SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 15, p. 9059–9060, jul. 1998.

SWIDERSKA, A.; BERNDTSON, A. K.; CHA, M. R.; LI, L.; BEAUDOIN, G. M. J.; ZHU, J.; FUQUA, C. Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 52, p. 49449–49458, dec. 2001.

VAN RHIJN, P.; FUJISHIGE, N. A.; LIM, P. O.; HIRSCH, A. M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 133–144, may 2001.

VISICK, K. L.; MCFALL-NGAI, M. J. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri* *Euprymna scolopes* partnership. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 7, p. 1779–1787, apr. 2000.

WAIS, R. J.; GALERA, C.; OLDROYD, G.; CATOIRA, R.; PENMETSA, R. V.; COOK, D.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; LONG, S. R. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 24, p. 13407-13412, nov. 2000.

WHITFIELD, C.; PAIMENT, A. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 338, n. 23, p. 2491-2502, nov. 2003.

WILKINSON, A.; DANINO, V.; WISNIEWSKI-DYE, F.; LITHGOW, J. K.; DOWNIE, J. A. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 16, p. 4510–4519, aug. 2002.

WISNIEWSKI-DYE, F.; JONES, J.; CHHABRA, S. R.; DOWNIE, J. A. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 6, p. 1597–1606, mar. 2002.

WITHERS, H.; SWIFT, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 186–193, apr. 2001.

Embrapa

Agrobiologia

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

