

ALTERAÇÕES NOS PERFIS PROTÉICOS (SDS-PAGE) DE ESTIRPES COMPETITIVAS DE *BRADYRHIZOBIUM* SP. NA FASE DE PRÉ-INFECÇÃO DA SOJA¹

DENISE REJANE DE CARVALHO E SILVA², MARIA RITA SCOTTI MUZZI MARQUES LEITÃO³
e MILTON ALEXANDRE TEIXEIRA VARGAS⁴

RESUMO - Em 1976 a estirpe SEMIA 566 de *Bradyrhizobium japonicum* (parental) foi introduzida nos Cerrados, onde formou apenas 2% dos nódulos de soja. Atualmente, o sorogrupo SEMIA 566 domina (60%) nos nódulos de soja nos Cerrados, deslocando a 29W e SEMIA 587 que ocupavam 90% dos nódulos. Visando compreender os mecanismos envolvidos na competitividade, estirpes SEMIA 566 isoladas dos Cerrados foram usadas como inoculante de soja cultivada em duas áreas de Cerrados. Os solos das duas áreas apresentavam populações residentes, respectivamente, dos sorogrupos 29W (Área 1) e SEMIA 587 (Área 2). As estirpes SEMIA 566, mais competitivas ante a 29W, diferem das que venceram a competição com a SEMIA 587. Após seis horas de contato com as raízes de soja, os isolados SEMIA 566 mais competitivos que a 29W apresentaram alterações, em eletroforese (SDS-PAGE), dos polipeptídios do envelope celular com peso molecular (PM) de 46-44kD e 37kD, e as mais competitivas que a SEMIA 587 modificaram as proteínas de 44kD, 42kD, 40kD e 37kD. As estirpes pouco competitivas apresentaram alterações tardias (doze horas) ou não modificaram esses polipeptídios. As estirpes SEMIA 566 isoladas, dos solos de Cerrados diferiram da estirpe SEMIA 566 parental, pela presença de uma proteína de 44kD. Portanto, esses isolados além de mais competitivos constituem nova subpopulação SEMIA 566.

Termos para indexação: competitividade, proteína.

CHANGES IN PROTEIN PROFILES (SDS-PAGE) OF COMPETITIVE *BRADYRHIZOBIUM* SP. STRAINS DURING SOYBEAN PRE-INFECTIVE STAGE

ABSTRACT - When the *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 566 (parental strain) was introduced into Cerrados soils (Savanna soils) in 1976, this strain was found to be able to occupy only 2% of soybean nodules. In contrast, strains 29W and SEMIA 587 both presented 90% of nodule occupancy. Nowadays, in the same type of soil, the serogroup 566 dominates (60%) in the soybean nodules, dislocating the 29W and SEMIA 587 strains. For comparative analysis of parental and adapted SEMIA 566, some strains SEMIA 566 were re-isolated from Cerrados and used as inoculant to soybean cultivated in two Cerrado areas. The first area showed a resident soil population of serogroup 29W (area 1), and in the second area the established soil population belongs to serogroup SEMIA 587 (area 2). The re-isolates that were more competitive in 29W area were different from those that have shown to be more competitive than SEMIA 587. After six hours of contact with soybean roots, the re-isolates SEMIA 566 that were more competitive than 29W presented alterations of electrophoretic (SDS-PAGE) polypeptidic bands of cellular envelope with molecular weight (MW) of 44-46kD and 37kD. On the other hand, the re-isolates that showed higher nodule occupancy levels in relation to SEMIA 587 registered alterations in proteins of 44kD, 42kD, 40kD and 37kD. The low competitive strains presented delayed alterations (12 hours) or did not modify these polypeptidic bands. The reisolates SEMIA 566 as well as the parental strain SEMIA 566, are serologically identical, differing from each other in the protein of 44kD which was absent in the parental strain. The strains SEMIA 566, isolated from Cerrados soils differed from the parental SEMIA 566 through the presence of a 44kD protein. Therefore, those isolates, besides being competitive, constitute a new SEMIA 566 subpopulation.

Index terms: competitiveness, protein.

¹ Aceito para publicação em 26 de fevereiro de 1998.

² Bióloga, Dep. de Botânica, ICB/UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, CEP 30270-110 Belo Horizonte, MG. Bolsista do CNPq.

³ Bióloga, Ph.D., Profª Adjunta, Dep. de Botânica, ICB/UFMG.

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Caixa Postal 08223, CEP 73301-970 Planaltina, DF.

INTRODUÇÃO

Na década de setenta, a soja foi introduzida nos Cerrados e infectada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (29W, SEMIA 587, SEMIA 566 (USDA 123), CB 1809, R54 A, 965, 532 C e outras). Entretanto, somente as estirpes 29W e SEMIA 587 persistiram nesses solos, ocupando cerca de 90% dos nódulos, contrastando com o sorogrupo SEMIA 566 cuja ocorrência nos nódulos era da ordem de 2% (Vargas et al., 1981). As estirpes 29W e SEMIA 587, dada a sua elevada competitividade pelos sítios de infecção nodular, sua elevada eficiência na fixação de N e baixa especificidade hospedeira (Peres et al., 1993), vêm sendo usadas como inoculante comercial da soja no Brasil, desde 1980. Porém, nessa última década, constataram-se alterações espontâneas na distribuição dos sorogrupos nos nódulos de soja em diferentes áreas de Cerrados. O sorogrupo SEMIA 566 passou a apresentar uma dominância, nos nódulos superior a 60%, deslocando as estirpes 29W e SEMIA 587 (Vargas et al., 1994). Esses dados sugerem que essa estirpe, após vinte anos de sua introdução nos solos de Cerrados, modificou sua capacidade competitiva. Essa tendência de dominância da estirpe SEMIA 566 não se restringiu aos Cerrados, ocorrendo também em solos do Planalto Rio-grandense, mas nesses solos a estirpe 29W ainda manteve sua superioridade (Vidor et al., 1983).

Os mecanismos que determinam a maior habilidade competitiva de uma estirpe em relação a outra ainda não são conhecidos. A predominância de uma estirpe nos nódulos nem sempre pode ser explicada pela influência dos fatores bióticos e abióticos (George et al., 1987; Postma et al., 1990), ou pela vantagem numérica de uma estirpe em relação a outra (Moawad et al., 1984), ou, ainda, pelo efeito seletivo do genótipo hospedeiro (Demezas & Bottomley, 1987). Também, algumas estirpes de *B. japonicum* dos sorogrupos USDA110 (George et al., 1987) e SEMIA 566 (Vargas et al., 1994) foram capazes de dominar nos nódulos, independentemente da variedade de soja.

A capacidade diferencial de ocupação dos nódulos pode também ser entendida como uma manifesta-

ção genotípica (Bhagwat et al., 1991; Triplett & Sadowsky, 1992). Reforça essa idéia o fato de a maior competitividade das estirpes do sorogrupo 566 isoladas dos Cerrados, em relação à 29W, também ter sido expressa em condições monoaxênicas de jarro de Leonard (Scotti et al., 1993). Nessa perspectiva, o caráter competitividade deve ser expresso nas primeiras etapas da comunicação entre microrganismo e planta, quando, provavelmente, ocorrerá a definição da estirpe ou grupo sorológico que ocupará os nódulos. Essa comunicação se inicia com a secreção de flavonóides pelas plantas hospedeiras, seguindo-se a expressão dos genes bacterianos *nod*, síntese de várias proteínas de membrana, culminando com a produção dos fatores Nod (Dénarié & Cullimore, 1993). Esses fatores Nod são lipooligossacarídeos capazes de elicitar a iniciação da divisão das células corticais a distância, crescimento do pêlo radicular, deformação dos pêlos radiculares, reorganização do citoplasma das células corticais, e despolarização da membrana (Ehrhardt et al., 1992). Similarmente, bactérias fitopatogênicas codificam proteínas de membrana que são consideradas fatores de virulência (Clarke et al., 1992).

Partindo da premissa de que a competitividade é um caráter geneticamente controlável, espera-se que estirpes que diferem quanto à capacidade competitiva manifestem essa divergência na própria célula no início do processo de infecção, e seja induzida pelo contato com a raiz da planta. Estudos de Scotti et al. (1993) evidenciaram que algumas estirpes do sorogrupo SEMIA 566 isoladas dos solos de Cerrados formaram um maior número de nódulos que a estirpe SEMIA 566 parental em condições assépticas de jarro de Leonard. A exposição dessas estirpes às raízes de soja elevou sua capacidade competitiva e induziu alterações protéicas na membrana, diferenciando as estirpes pouco competitivas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade competitiva de re-isolados SEMIA 566 em relação às estirpes 29W e SEMIA 587, em condições de campo, e correlacionar os níveis de competitividade com as alterações nos perfis protéicos (SDS-PAGE), após exposição às raízes de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de competitividade em campo

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), foi cultivada em duas áreas experimentais da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), as quais tinham recebido inoculação, nos anos anteriores, das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, dos sorogrupos 29W (Área 1- predomínio da 29W) e SEMIA 587 (Área 2- com predomínio da SEMIA 587). No ano de execução do experimento, foi feita a inoculação das estirpes 406, 220, 204, 340, 370, 381, 372, 516 e 172, pertencentes ao sorogrupo SEMIA 566, re-isoladas dos solos de Cerrados, incluídas na coleção da Embrapa-CPAC. Os nódulos de soja foram coletados e analisados por imunoaglutinação (Somasegaren & Hoben, 1985), com os soros 29W, SEMIA 587 e SEMIA 566, para a identificação do sorogrupo dominante em um determinado nódulo.

Exposição das estirpes do sorogrupo 566 às raízes de soja

Estirpes de *B. japonicum* do sorogrupo da SEMIA 566 (406, 220, 204, 340, 370, 381, 372, 516 e 122), adaptadas aos Cerrados, foram desenvolvidas em meio YM (Vincent, 1970) e expostas às raízes de plântulas de soja (var. Doko). A partir de culturas puras, as bactérias foram transferidas para o meio YMB (Vincent, 1970). Esse material foi centrifugado a 10.000 rpm, obtendo-se, ao final, três "pellets" igualmente proporcionais, que corresponderam aos três tratamentos. Cada "pellet" foi ressuspensão, com PBS pH 7,4, em recipientes vedados com papel alumínio. Raízes de plântulas de soja (var. Doko) foram mergulhadas nessa suspensão bacteriana, através de orifícios no papel laminado. Todo esse procedimento foi realizado em condições assépticas. Os tratamentos consistiram de: 1. estirpes-controle (0 h), as quais não entraram em contato com as raízes hospedeiras; 2. estirpes submetidas ao contato com raízes hospedeiras, por seis horas, à temperatura ambiente; e 3. estirpes submetidas ao contato com raízes hospedeiras, por doze horas, à temperatura ambiente.

Extração das proteínas do envelope celular

As células peletizadas dos três tratamentos foram lavadas em PBS pH 7,4, centrifugadas a 10.000 rpm, por cinco minutos, e ressuspensas em Tris-HCl 50 mM. Em seguida, foram lisadas por sonicação, e centrifugadas a 10.000 rpm. A extração das proteínas do envelope celular foi feita segundo Maagd et al. (1988). O conteúdo protéico

das amostras foi padronizado pelo método de Bradford (1976), empregando-se 25 µg de proteínas por canaleta, na eletroforese.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras protéicas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, em gradiente de 7,5% a 17,5% (Laemmli, 1970; Nowotny et al., 1979), calculando-se os pesos moleculares da proteína. Os géis foram corados com coomassie blue R-250 0,1% (p/v). Os perfis eletroforéticos protéicos de cada tratamento, evoluídos em cada canaleta do gel, foram analisados em densitômetro computadorizado (Zênite Z-30). Esse aparelho registra as leituras das bandas polipeptídicas na forma de picos. O tamanho dos picos é proporcional à densidade do corante no gel que, por sua vez, é proporcional à quantidade de proteínas. Portanto, quando se trata de proteínas heterogêneas, pode-se, através da densitometria, estimar alterações de concentração, comparando-se a mesma proteína, assim como determinar as posições das proteínas. O tamanho de cada pico foi estimado por um índice, calculado para cada polipeptídeo em cada canaleta. Neste índice (X-0/0), X representa o tamanho do pico analisado, e 0, o tamanho do pico de referência. Esse peptídeo de referência, presente em cada canaleta, foi escolhido por apresentar poucas variações durante os tratamentos. O emprego desse índice minimiza as possíveis variações de concentração de amostra, de uma canaleta para outra, uma vez que as análises são feitas sempre em relação a um mesmo pico de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostrados na Tabela 1 evidenciam que as estirpes adaptadas aos solos de Cerrados (sorogrupo SEMIA 566) foram reconhecidas pelo anti-soro da SEMIA 566. A maioria dos isolados SEMIA 566 foram mais competitivos pelos sítios de infecção que as estirpes 29W e SEMIA 587. As estirpes que predominaram nos nódulos de soja cultivada na área com população estabelecida do sorogrupo 29W (Área 1) são diferentes das que prevaleceram nos nódulos da Área 2, onde a população residente é do sorogrupo SEMIA 587. Exemplo disto é a estirpe 220, que ocupou 47% dos nódulos quando em competição com a 29W e 72% dos nódulos na Área 2.

TABELA 1. Distribuição percentual dos grupos sorológicos de *Bradyrhizobium* sp. em nódulos de soja, cultivada em áreas de Cerrados com populações estabelecidas dos sorogrupos 29W (Área 1) e SEMIA 587 (Área 2), que recebeu inoculação de estirpes do sorogrupo da SEMIA 566 isoladas dos Cerrados.

Estirpes (sorogrupo SEMIA 566)	Área 1				Área 2			
	(Predomínio da 29W)				(Predomínio da SEMIA 587)			
	29W	587	566	SR ¹	29W	587	566	SR ¹
Testemunha	38,0	5,5	46,5	10,0	4,5	32,5	50,5	12,0
406	31,0	0,0	38,5	30,5	2,0	20,5	56,5	21,0
220	50,5	0,0	47,0	3,0	0,0	23,5	72,0	4,0
204	34,0	0,0	57,0	9,5	1,5	41,5	55,0	1,5
370	23,0	1,5	67,0	8,0	1,0	30,5	67,0	1,0
340	18,0	1,0	67,5	13,0	4,0	27,0	69,0	0,0
381	21,0	1,5	68,0	9,4	1,0	12,0	78,0	9,0
372	15,5	0,0	71,5	13,0	0,0	38,5	58,5	3,0
516	9,5	2,0	73,0	15,0	0,0	34,0	60,5	5,0
122	20,0	1,0	79,0	1,0	0,0	32,0	66,0	2,0

¹ Sem reação.

A análise dos perfis protéicos (SDS-PAGE) dessas estirpes evidencia que as raízes de soja induziram modificações na intensidade de alguns polipeptídios do envelope celular, especialmente os de PM \approx 46kD, 44kD, 42kD, 40kD e 37kD, conforme já observado em condições de vaso de Leonard (Scotti et al., 1993). Alterações metodológicas, tais como redução do tempo de sonicação das estirpes testadas e das rotações (10.000 rpm) durante o processo de extração, permitiram a detecção de um maior número de bandas eletroforéticas nas estirpes analisadas, em comparação com os resultados anteriormente obtidos (Scotti et al., 1993). Essas alterações metodológicas permitiram o desmembramento da proteína única de 44kD em 46kD e 44kD, e da proteína de 40kD em 42kD e 40kD.

A estirpe 29W apresentou sensíveis alterações nos polipeptídios de PM \approx 46-44kD e 37kD (picos -1, 2.1, e 3) após seis horas de contato com as raízes de soja (Fig. 1), conforme já observado anteriormente (Scotti et al., 1993). Os isolados SEMIA 566 tais como as estirpes 204 (Fig. 2), 370 (Fig. 3), 381 e 372 (Fig. 4) e o isolado 516 (Fig. 5), capazes de vencerem a competição com a estirpe 29W (Tabela 1), apresentaram modificações nas mesmas proteínas após seis horas de tratamento, ou então, apresentaram uma ou mais dessas bandas constitutivamente

intensas, como observado nas estirpes 370 (Fig. 3) e 122 (Fig. 5). Por outro lado, essas estirpes apresentaram também fortes alterações nos polipeptídios de PM \approx 42kD e 40kD (picos 2.0 e 2.2). Entretanto, nas estirpes pouco competitivas (566 parental e 406, Fig. 6 e Tabela 1), ocorreu uma tardia (doze horas) intensificação das proteínas de PM \approx 46-44kD e 37kD, respectivamente picos 1, 2.1 e 3, ou somente a proteína de PM \approx 37kD foi alterada (estirpe 220, Fig. 2). Portanto, independentemente das alterações ocorridas nos demais polipeptídios, a resposta fraca ou tardia nas proteínas de PM \approx 46kD, PM \approx 44kD e 37kD caracteriza as estirpes com menores índices de competitividade em relação à 29W, conclusão essa que confirma os resultados anteriormente obtidos (Scotti et al., 1993).

A exposição às raízes de soja induziu na estirpe SEMIA 587 rápida (seis horas) intensificação dos polipeptídios de PM \approx 44kD e 42kD, e respostas tardias (doze horas) nos de PM \approx 46kD e 37kD (Fig. 1). As estirpes isoladas dos Cerrados, com baixa capacidade de nodulação em relação à SEMIA 587 (Tabela 1), estirpe 406 (Fig. 6), estirpe 204 (Fig. 2), e estirpe 372 (Fig. 4), caracterizaram-se pelas fracas ou tardias modificações dessas proteínas. Contrastantemente, as estirpes 220 (Fig. 2); 340 (Fig. 3); e 381 (Fig. 4), que predominaram nos

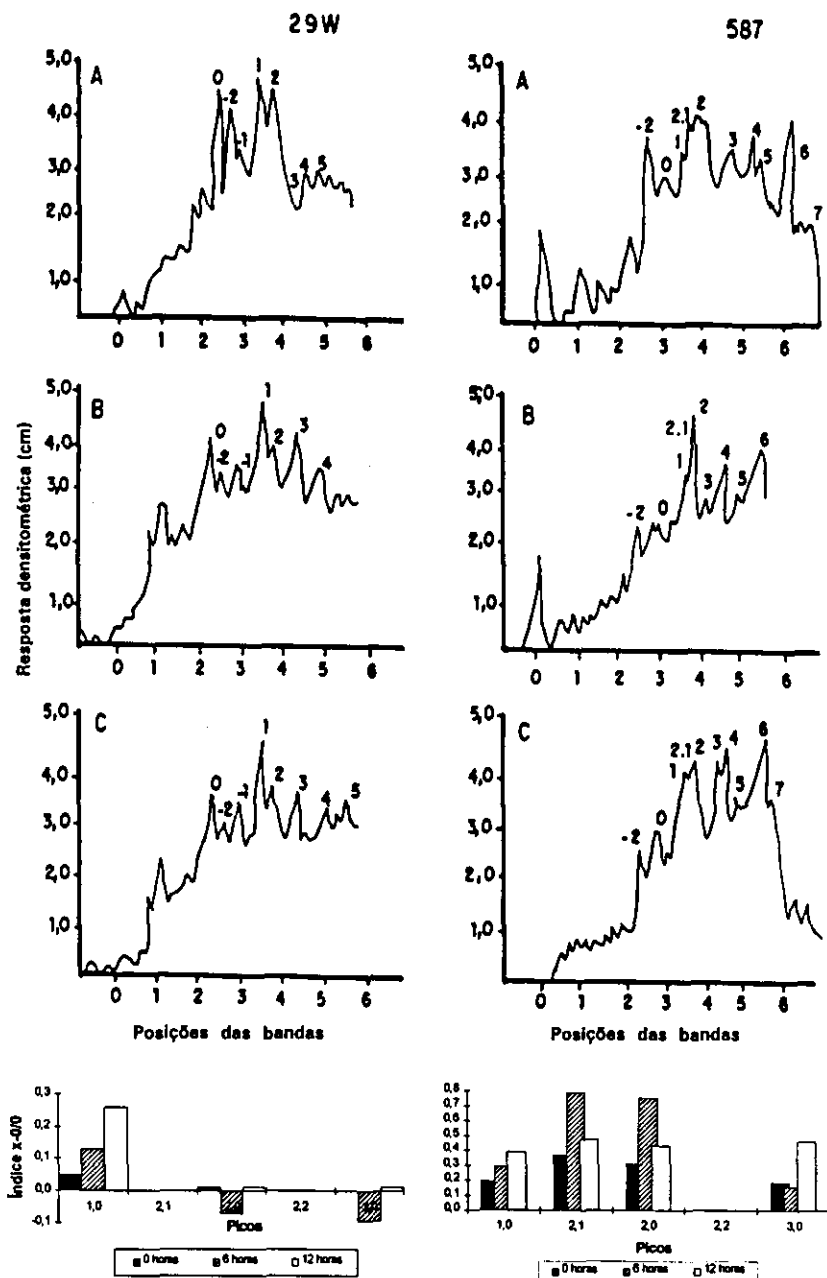


FIG. 1. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. elkanii* 29W e SEMIA 587 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM \cong 46kD; Pico 2.1: PM \cong 44kD; Pico 2.0: PM \cong 42kD; Pico 2.2: PM \cong 40 kD; Pico 3: PM \cong 37kD; Pico 4: PM \cong 35kD; Pico 5: PM \cong 32kD; Pico 6: PM \cong 29kD). Fonte: Scotti et al. (1993).

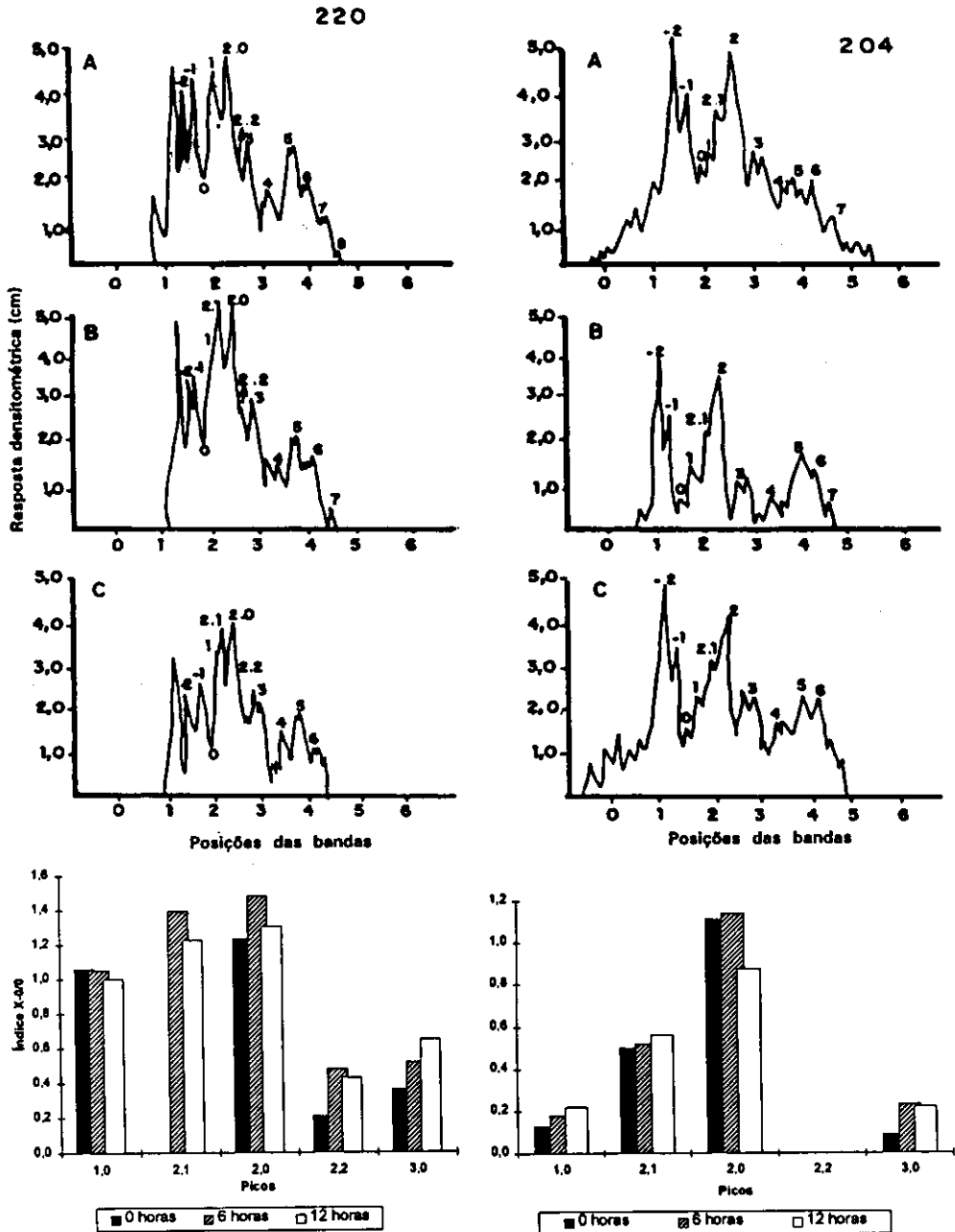


FIG. 2. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. japonicum* 220 e 204 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM \cong 46kD; Pico 2.1: PM \cong 44kD; Pico 2.0: PM \cong 42kD; Pico 2.2: PM \cong 40 kD; Pico 3: PM \cong 37kD; Pico 4: PM \cong 35kD; Pico 5: PM \cong 32kD; Pico 6: PM \cong 29kD).

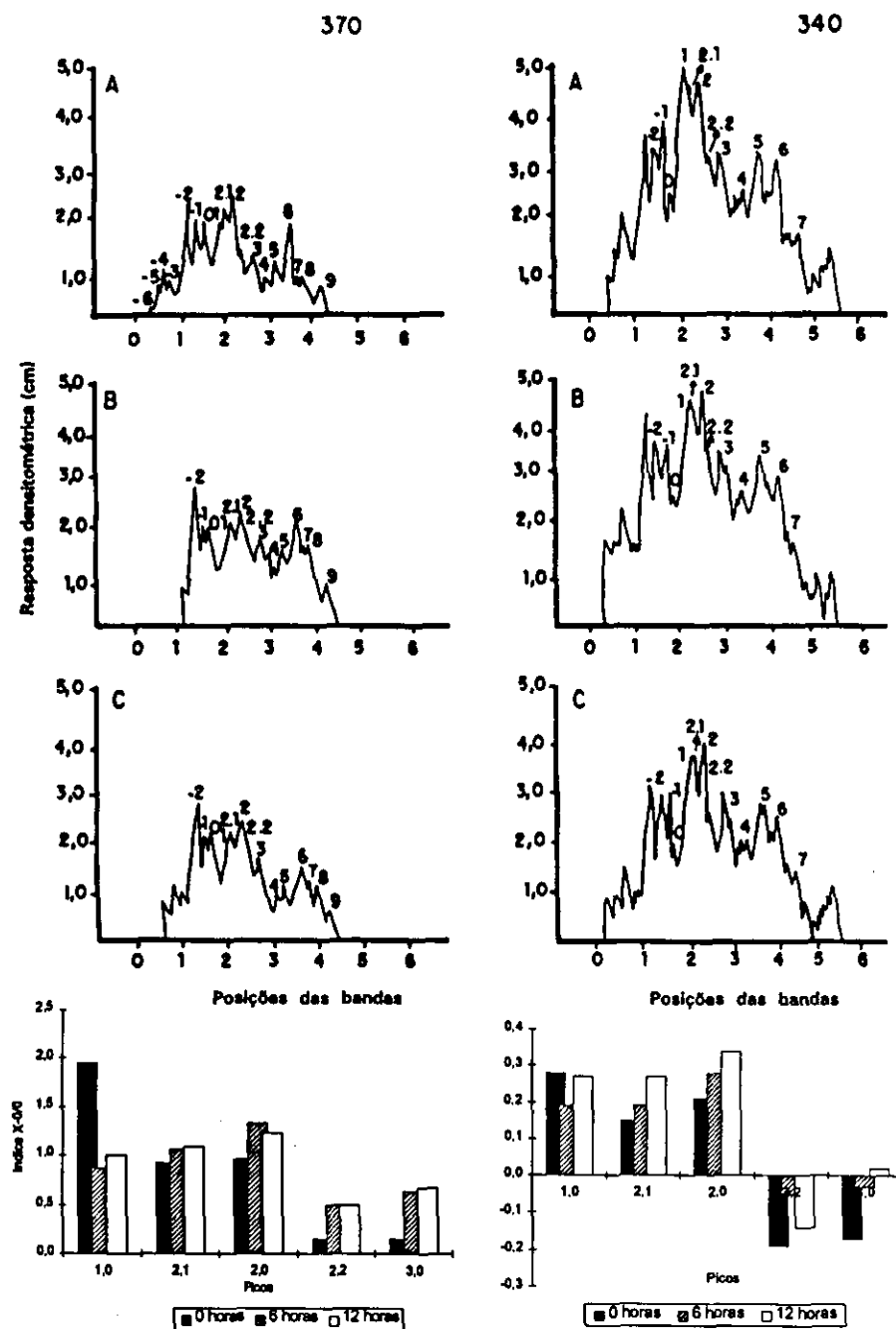


FIG. 3. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. japonicum* 370 e 340 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM \approx 46kD; Pico 2.1: PM \approx 44kD; Pico 2.0: PM \approx 42kD; Pico 2.2: PM \approx 40 kD; Pico 3: PM \approx 37kD; Pico 4: PM \approx 35kD; Pico 5: PM \approx 32kD; Pico 6: PM \approx 29kD).

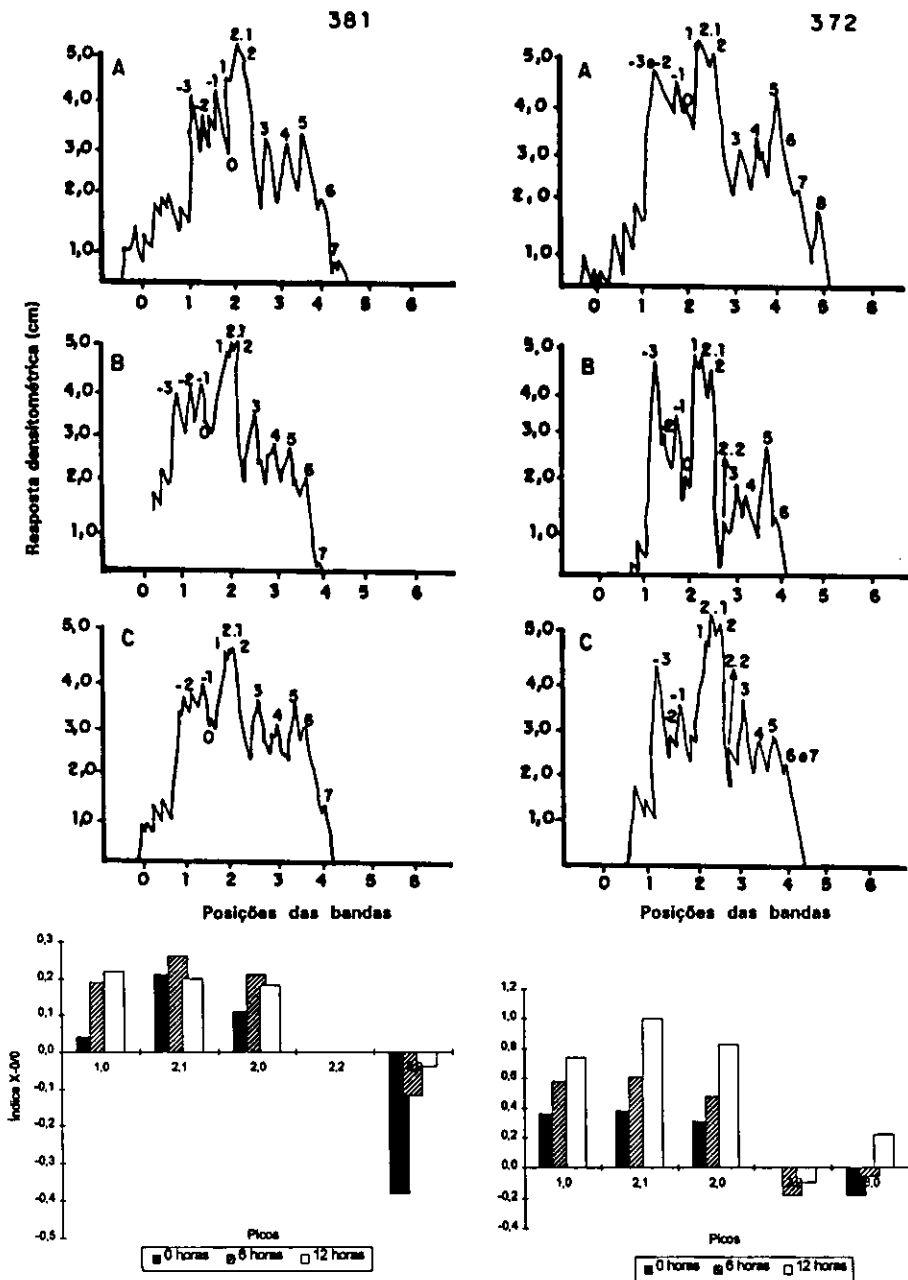


FIG. 4. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. japonicum* 381 e 372 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM≅ 46kD; Pico 2.1: PM≅ 44kD; Pico 2.0: PM≅ 42kD; Pico 2.2: PM≅ 40 kD; Pico 3: PM≅ 37kD; Pico 4:PM≅ 35kD; Pico 5: PM≅ 32kD; Pico 6: PM≅ 29kD).

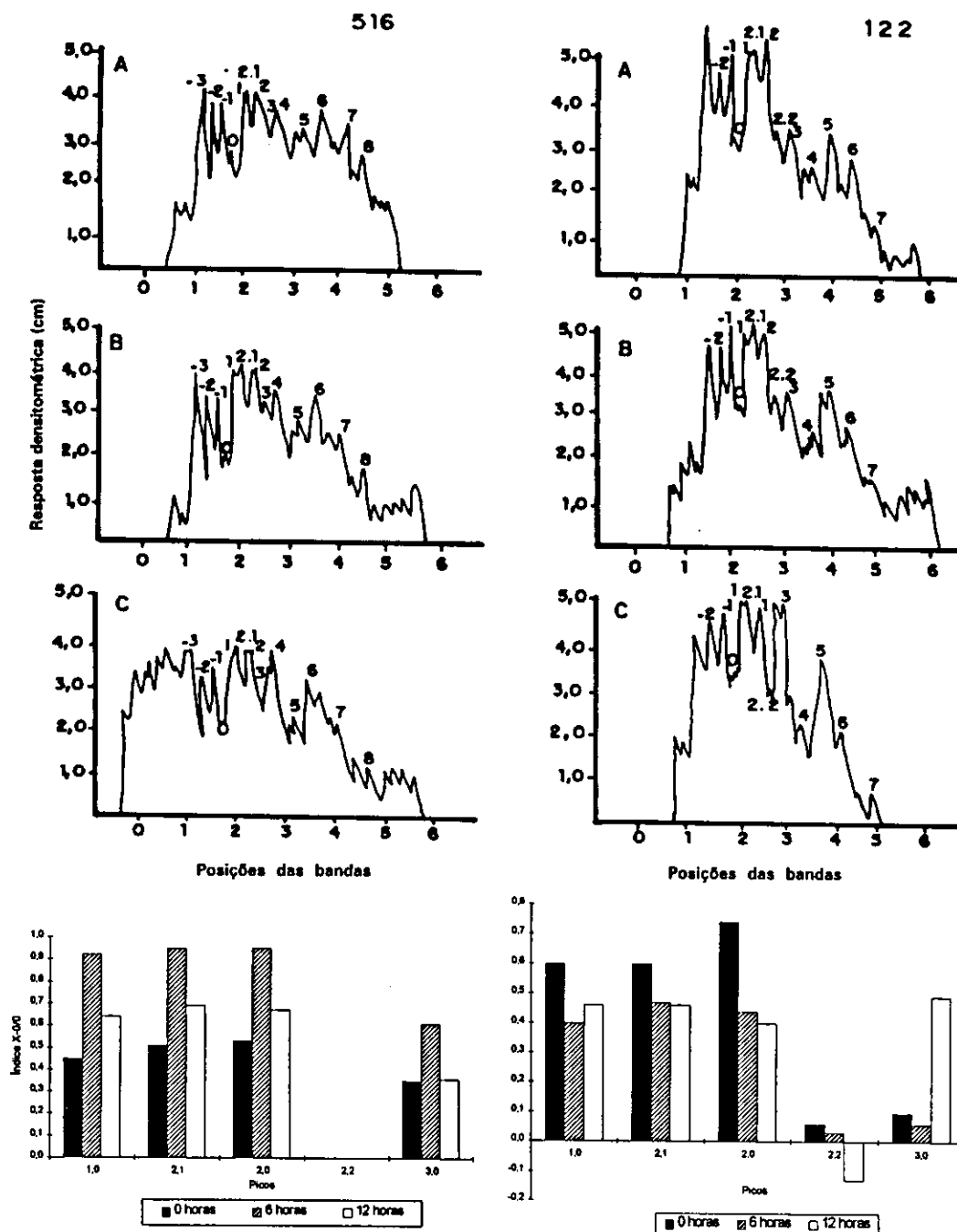


FIG. 5. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. japonicum* 516 e 122 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM \cong 46kD; Pico 2.1: PM \cong 44kD; Pico 2.0: PM \cong 42kD; Pico 2.2: PM \cong 40 kD; Pico 3: PM \cong 37kD; Pico 4: PM \cong 35kD; Pico 5: PM \cong 32kD; Pico 6: PM \cong 29kD).

nódulos de soja na Área 2, exibiram uma rápida intensificação (seis horas), tanto nos referidos polipeptídios de $PM \cong 44kD$ e $42kD$, como na proteína de $PM \cong 37kD$, após exposição às raízes de soja.

O isolado 370, que se apresentou igualmente competitivo nas áreas 1 (29W) e 2 (587) (Tabela 1), exibiu a proteína de $PM \cong 46kD$, constitutivamente intensa, e fortes alterações foram induzidas pelas raízes de soja, após seis horas de tratamento, nas proteínas de $PM \cong 44kD$, $42kD$, $40kD$ e $37kD$ (Fig. 3). Similarmente, as estirpes SEMIA 566 que apresentaram elevados níveis de nodulação nas duas áreas (estirpe 340, Fig. 3; estirpes 381 e 372, Fig. 4; estirpe 516, Fig. 5, e Tabela 1) registraram também fortes alterações em todos esses polipeptídios, garantindo o sucesso frente a qualquer dos competidores (29W e SEMIA 587). As observações anteriores, em condições de vaso de Leonard, permitiram sugerir que as alterações nos polipeptídios de $46-44kD$ e de $37kD$ poderiam representar estratégias competitivas das estirpes do sorogrupo 566. Os resultados aqui apresentados não só confirmam mas também esclarecem que a principal estratégia competitiva para vencer a 29W foi a participação dos polipeptídios de $PM \cong 46-44kD$ e $37kD$, enquanto em relação à SEMIA 587, o requisito foi o envolvimento das proteínas de $PM \cong 44kD$, $42kD$, e $37kD$.

Essas modificações foram provocadas pela interação planta-microrganismo, na fase de pré-infecção, e parecem estar correlacionadas com os padrões competitivos. A exposição de estirpes de rizóbios ao exsudato de plantas hospedeiras ou a flavonóides específicos pode determinar a expressão e regulação dos genes *nod* (Redmond et al., 1986; Dénarié et al., 1992), a expressão dos genes *exo* (Leigh & Coplin, 1992) ou induzir um efeito quimiotático (Dharmatilake & Bauer, 1992). As proteínas do envelope celular de *B. japonicum*, envolvidas na interação planta-bactéria, podem estar relacionadas com produtos metabólicos dos genes *nod*, já que 40% desses genes produzem proteínas de membrana (Dénarié et al., 1992). Reforça essa idéia o fato de flavonóides, tipo luteolina, induzirem modificações nas proteínas de membrana de *R. meliloti*, resultando na síntese de novas bandas protéicas ($60-44kD$), registradas em perfil eletroforético. Uma

dessas bandas ($44 kD$) é produto do gene *nod C* (Hubac et al., 1992).

Provavelmente, as modificações protéicas das estirpes de *B. japonicum* constituem respostas bacterianas aos sinais moleculares dos exsudatos das raízes. As estirpes que responderam a esse sinal com maior intensificação desses polipeptídios, ou que apresentaram essas proteínas constitutivamente intensas, foram capazes de ocupar maior número de nódulos.

Verificou-se, além disso, uma estratégia peculiar desenvolvida pela competitiva estirpe 122 (Tabela 1; Fig. 5), na qual todos os polipeptídios de $PM = 46kD$ (pico 1), $44kD$ (pico 2.1) e $42kD$ (pico 2) são originalmente muito intensos. Após exposição às raízes do hospedeiro, ocorreu redução na intensidade dessas bandas. Similarmente, Scotti et al. (1993) observaram que as estirpes muito competitivas de *B. japonicum*, após contato com raízes de soja, apresentaram redução dos níveis de ocupação dos nódulos, assim como uma inibição na síntese desses mesmos polipeptídios. A tendência de redução dessas proteínas pode ser entendida pela perspectiva da ação de flavonóides estimuladores e inibidores no controle da expressão dos genes envolvidos na nodulação, o que promoveria o controle da infecção (Rostas et al., 1986), ou, ainda, poderia ser devida a um excesso de produtos protéicos, que exerceriam um efeito de "feedback" negativo nos genes produtores (Knight et al., 1986).

A estirpe SEMIA 566 parental parece diferir das estirpes isoladas dos Cerrados, não só no aspecto da competitividade, mas também por não apresentar um polipeptídio de $44kD$ em eletroforese (SDS-PAGE), o qual está presente em todas as estirpes adaptadas aos Cerrados. Esse dado sugere que a estirpe SEMIA 566 parental pertence a um grupo populacional diferente dos isolados SEMIA 566 dos Cerrados.

As proteínas da membrana externa são importantes para a virulência de alguns fitopatógenos, e variações dessas proteínas podem estar relacionadas com os grupos de virulência (patovar), segundo Ojanen et al. (1993). Na família Rhizobiaceae, o estudo comparado das proteínas de membrana vem sendo empregado como indicador taxonômico, e a similaridade entre estirpes indica não só a proximida-

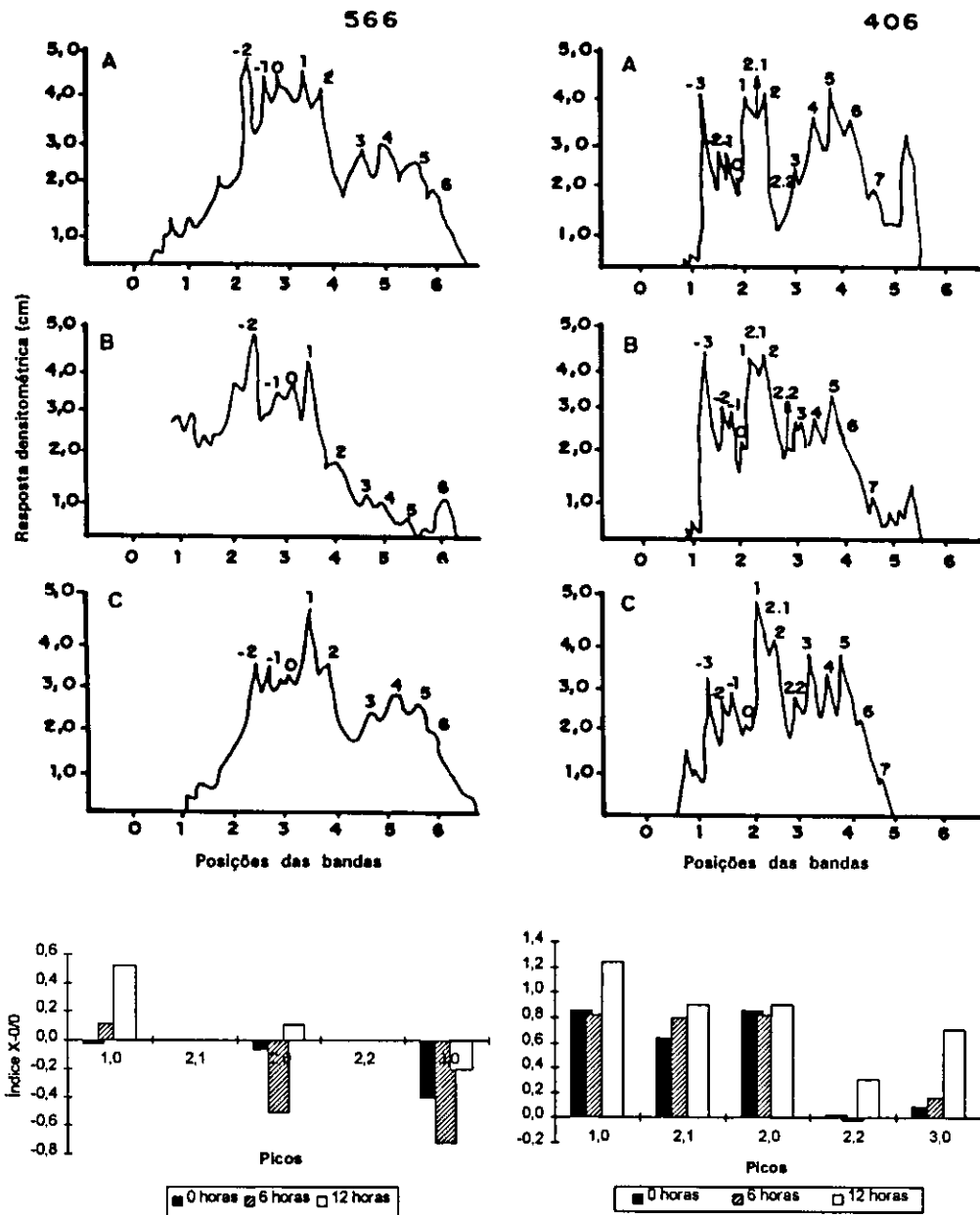


FIG. 6. Leituras densitométricas das bandas polipeptídicas (SDS-PAGE) do envelope celular das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 566 parental (Fonte: Scotti et al. (1993) e 406 e seus respectivos índices de variação (X-0/0) durante os tratamentos: controle (A), 6 horas (B) e 12 horas (C) de exposição às raízes de soja. (Pico 1: PM \cong 46kD; Pico 2.1: PM \cong 44kD; Pico 2.0: PM \cong 42kD; Pico 2.2: PM \cong 40 kD; Pico 3: PM \cong 37kD; Pico 4: PM \cong 35kD; Pico 5: PM \cong 32kD; Pico 6:PM \cong 29kD).

de taxonômica, mas também a homogeneidade populacional (Maagd et al., 1988; Arredondo-Peter & Escamilla, 1993). Portanto, a ausência do polipeptídeo de 44kD na população SEMIA 566 parental resulta na diferenciação não só de uma subpopulação mas também de um grupo populacional menos competitivo.

A nodulação promovida por um determinado sorogrupo pode ser restringida pelo genótipo hospedeiro, o que ocorre antes ou após a formação do primórdio nodular (Sadowsky et al., 1995). Entretanto, esse efeito depende também do genótipo bacteriano, pois um único gene bacteriano, *nol A*, ativado pelos flavonóides, pode exercer um controle negativo na expressão dos genes *nod*, seja controlando a superexpressão dos genes *nod*, seja regulando outros genes, ainda desconhecidos, necessários ao desenvolvimento da nodulação (Dockendorff et al., 1994). Apesar da dominância do sorogrupo da SEMIA 566 nos nódulos de soja ter sido independente da variedade de soja usada no plantio (Vargas et al., 1994), seria recomendável desenvolver um amplo estudo em relação às novas variedades de soja cultivadas nos Cerrados, pois não se conhece o potencial restritivo destas em relação às estirpes selecionadas, SEMIA 566, 29W e SEMIA 587.

CONCLUSÕES

1. As estirpes SEMIA 566, adaptadas aos Cerrados, não só apresentam superioridade competitiva em relação à 29W e SEMIA 587, em condições de campo, mas também apresentam uma proteína de 44kD, em eletroforese (SDS-PAGE).

2. Essas estirpes constituem uma subpopulação SEMIA 566, dada a presença da proteína adicional.

3. Estirpes SEMIA 566, adaptadas aos solos de Cerrados, que competem com a 29W, registram rápidas modificações nos polipeptídios de PM \cong 46-44kD e 37kD, induzidas pelas raízes de soja.

4. Estirpes SEMIA 566, com baixa capacidade competitiva em relação à 29W, apresentam alterações tardias ou deficientes das mesmas proteínas, após exposição às raízes de soja.

5. Em relação à estirpe SEMIA 587, as estirpes SEMIA 566 competitivas apresentam em comum alterações nas proteínas de PM \cong 44kD, 42kD, 40kD e 37kD, após exposição às raízes de soja.

6. Nas estirpes SEMIA 566 com baixos níveis de ocupação dos nódulos, essas modificações nos polipeptídeos de PM \cong 44kD, 42kD, 40kD e 37kD são fracas, tardias ou não ocorrem.

7. Rápidas modificações qualitativas e quantitativas nas proteínas de PM \cong 46kD, 44kD, 42kD, 40kD e 37kD, ou a presença constitutiva desses polipeptídeos, são características que conferem vantagens competitivas às estirpes 566 adaptadas aos Cerrados frente a ambos os competidores, 29W e SEMIA 587.

8. Essas alterações protéicas são geneticamente controláveis e são expressas nas primeiras etapas do processo de infecção radicular pelo *Bradyrhizobium* sp. em soja.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq, pelas bolsas concedidas aos técnicos do Laboratório de Interação Microrganismo-Planta da UFMG e da Embrapa-CPAC.

REFERÊNCIAS

- ARREDONDO-PETER, R.; ESCAMILLA, E. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis protein binding patterns among *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strains isolated from Mexican bean *Phaseolus coccineus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.11, p.3960-3962, 1993.
- BHAGWAT, A.A.; TULLY, R.E.; KEISTER, D.L. Isolation and characterization of a competition defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.12, p.3496-3501, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- CLARKE, H.R.G.; LEIGH, J.A.; DOUGLAS, C.J. Molecular signals in the interactions between plants and microbes. *Cell*, v.71, n.16, p.191-199, 1992.

- DOCKENDORFF, T.C.; SANJUAN, J.; GROB, P.; STACEY, G. Nol A represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.7, n.5, p.596-602, 1994.
- DÉNARIÉ, J.; CULLIMORE, J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview: new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, v.74, n.1, p.951-954, 1993.
- DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, J.; ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Review of Microbiology*, v.46, n.1, p.497-531, 1992.
- DEMEZAS, D.H.; BOTTOMLEY, P.J. Influence of soil and nonsoil environments on nodulation by *Rhizobium trifolii*. *Applied Environmental Microbiology*, v.53, n.3, p.596-597, 1987.
- DHARMATILAKE, A.J.; BAUER, W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene inducing compounds from alfalfa roots. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.4, p.1153-1158, 1992.
- EHRHARDT, D.W.; ATKINSON, E.M.; LONG, S.R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, v.256, n.2, p.998-1000, 1992.
- GEORGE, T.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. *Bradyrhizobium japonicum* environment interactions: nodulation and interstrain competition in soils along an elevational transect. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.5, p.1113-1117, 1987.
- HUBAC, C.; GUERRIER, D.; FERRAN, J.; TRÉMOLIÈRES, A.; KONDOROSI, A. Lipid and protein composition of outer and inner membranes in wild-type strains and nod mutants of *Rhizobium meliloti*. *Journal of General Microbiology*, v.138, n.6, p.1973-1983, 1992.
- KNIGHT, C.D.; ROSSEN, L.; ROBERTSON, J.G.; WELLS, B.; DOWNIES, J.A. Nodulation inhibition by *Rhizobium leguminosarum* multicopy *nod* ABC genes and analysis of early stages of plant infection. *Journal of Bacteriology*, v.166, n.2, p.552-558, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.15, p.680-685, 1970.
- LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L. Exopolysaccharides in plant-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, v.46, p.307-346, 1992.
- MAAGD, R.A.; ROSSUM, C. van; LUGTENBERG, J.J. Recognition of individual strains of fast growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology*, v.170, n.8, p.3782-3785, 1988.
- MOAWAD, H.A.; ELLIS, W.R.; SCHMIDT, E.L. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field grown soybeans. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.4, p.607-612, 1984.
- NOWOTNY, A. *Basic exercises immunochemistry*. New York: Spring-Verlag, 1979, 313p.
- OJANEN, T.; HELANDER, M.; HAAHTELA, K.; KORHONEN, T.K.; LAAKSO, T. Outer membrane proteins and lipopolysaccharides in pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.12, p.4143-4151, 1993.
- PERES, J.R.R.; MENDES, I. de C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de Cerrados. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, Campinas, v.17, n.3, p.357-363, 1993.
- POSTMA, W.J.; HOK-AHIN, C.H.; VEEN, J.A. van. Role of microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.21, n.2, p.437-442, 1990.
- REDMOND, J.W.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M.A.; INNES, R.W.; KUEMPEL, P.L.; BARRY, G.R. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*, v.323, n.16, p.632-634, 1986.
- ROSTAS, K.; KONDOROSI, E.; HORVATH, B.; SIMONISITIS, A.; KONDOROSI, A. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in rhizobia. *Proceedings of National Academy of Sciences*, Washington, v.83, n.6, p.1757-1761, 1986.
- SADOWSKY, M.J.; KOSSLAK, R.M.; MADRZAK, C.J.; GOLINSKA, B.; CREGAN, P.B. Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is

- mediated by factors present in the roots of *Glycine max*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.2, p.832-836, 1995.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; NEVES, M.C.P.; PAIVA, E.; DÖBEREINER, J. Effect of soybean roots on strain competitiveness and protein profiles of *Bradyrhizobium japonicum* adapted to Cerrados soils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.65, n.4, p.427-438, 1993.
- SOMASEGAREN, P.; HOBEN, H.J. *Methods in legume Rhizobium technology*. Hawaii: Niftal, 1985. 367p.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology*, v.46, p.399-428, 1992.
- VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. Reinoculação da soja em função dos sorogrupos de *Rhizobium japonicum* predominantes em solos de Cerrados. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1980, Brasília: Anais... Embrapa-CPAC, 1981. p.715-723.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Inoculation of soybean in Cerrados soils with established populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista de Microbiologia*, v.25, n.4, p.245-250, 1994.
- VIDOR, C.; GRIEBLER, J.L.; DUTRA, L.M.C.; SANGOI, L.; PEREIRA, J.S. Ocorrência e distribuição de sorogrupos de *Rhizobium japonicum* em solos do Planalto Rio-grandense. *DIVULGAÇÃO do Departamento de Solos da UFRGS*. Porto Alegre, 1983, 3p.
- VINCENT, J.M. *A manual for the practical study for root nodule bacteria*. IBP handbook. Oxford: Blackwell, 1970, 164p.