

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Nodulação e Expressão dos Genes Enod40 e
Leghemoglobina em Feijoeiro sob Diferentes Níveis
de Fósforo na Semente e no Substrato**

Roselaine Sanchez da Silva de Oliveira

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**NODULAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES ENOD40 E
LEGHEMOGLOBINA EM FEIJOEIRO SOB DIFERENTES
NÍVEIS DE FÓSFORO NA SEMENTE E NO SUBSTRATO**

ROSELAINÉ SANCHEZ DA SILVA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor

Adelson Paulo de Araújo

e Co-orientação do Pesquisador

Jean Luiz Simões-Araújo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ

Março de 2011

635.652
O48n
T

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva de,
1982-

Nodulação e expressão dos genes Enod40 e leghemoglobina em feijoeiro sob diferentes níveis de fósforo na semente e no substrato / Roselaine Sanchez da Silva de Oliveira. - 2011.

44 f.: il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo.

Bibliografia: f.36-42.

1. Feijão - caupi - Semente - Teses. 2. Feijão - Teor de fósforo - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Solos - Teor de fósforo - Teses. I. Araújo, Adelson Paulo de, 1963- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

ROSELAINÉ SANCHEZ DA SILVA DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/03/2011

Adelson Paulo Araújo. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Rosângela Stralotto. Dra. Embrapa Agrobiologia

Sônia Regina de Souza. Dra. UFRRJ

Viviane Radl. Dra. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,
A Deus, sem ele nada seria possível.
Aos meus pais Luiz Alberto Marins de Oliveira e
Ivonete Maria da Silva de Oliveira,
Pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Bom Deus por toda a experiência que tem me permitindo passar. Obrigada pela sua presença em minha vida.

Aos meus pais Luiz Alberto Marins de Oliveira e Ivonete Maria da Silva de Oliveira, os quais se dedicaram a mim incansavelmente, sem os quais seria impossível minha caminhada até os dias de hoje.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio estrutural, financeiro e de pessoal para desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Adelson Paulo de Araújo pelo grande apoio, crítica, orientação, ajuda e conselhos que muito contribuíram na minha reflexão.

Ao meu co-orientador, Dr. Jean Simões Araújo, pela paciência e ajuda na elaboração do presente trabalho.

Ao meu grande amigo Selenobaldo Alexinaldo Cabral Sant'anna, por quem tenho enorme admiração e carinho, por ter compartilhado os momentos tão difíceis nesta etapa da minha vida.

Aos funcionários da Embrapa Tatiane Vidal, Claudio Pereira, Geraldo, Monalisa, Roberto e Ernani, pelo auxílio e dedicação fundamentais para realização deste trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação, Jakson Leite, Helder Anderson Pinto e Alexandro de Paula, pela ajuda e pelos momentos de distração.

Aos funcionários da secretaria do Curso de Pós-Graduação, Marquinho e Roberto, pelos esclarecimentos e auxílios.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo.

A todos que fizeram parte deste caminho.

Muito Obrigada!!!

BIOGRAFIA

Roselaine Sanchez da Silva de Oliveira nasceu na cidade de Niterói-RJ, em 10 de março de 1982, tendo concluído o ensino médio em 2000. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no segundo semestre de 2003, vindo a graduar-se em 2008. Durante o curso de graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq no Laboratório de Fertilidade do Solo da UFRRJ. Ingressou no programa de Mestrado do CPGA-CS da UFRRJ em março de 2009, desenvolvendo seu trabalho junto ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agrobiologia.

RESUMO

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva. **Nodulação e expressão dos genes do *Enod40* e da leghemoglobina em feijoeiro sob diferentes níveis de fósforo na semente e no substrato.** 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Sementes enriquecidas com P aumentam a nodulação e a acumulação de N do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) particularmente sob baixa disponibilidade de P no substrato. Apresenta-se a hipótese de que sementes enriquecidas com P podem antecipar o processo de nodulação e fixação biológica de N₂. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos teores de P na semente sobre o início dos processos de nodulação e fixação de N₂, sob diferentes níveis de P no substrato, através da análise da expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* pela técnica de PCR em tempo real. Foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia. O primeiro experimento teve objetivo de ajustar os níveis de P no substrato para permitir a adequada manifestação do efeito do P da semente, sendo constituídos por dois teores de P na semente (baixo e alto), cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (0, 125, 250, 500 e 1000 µM de P) e duas épocas de coleta (30 e 42 dias após emergência - DAE). O alto P da semente aumentou a nodulação, o acúmulo de N e a massa seca de parte aérea nos níveis de 0, 125 e 250 µM de P aos 30 e 43 DAE. No segundo experimento foi avaliada a eficiência dos iniciadores através da técnica de PCR em tempo real, sendo analisados dois teores de P na semente em combinação com dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (150 e 500 µM de P), em três épocas de coleta. O alto P da semente aumentou a massa de nódulos aos 10 DAE no nível 150 µM de P. Foram selecionados os genes referência *PvAct2* e *Ef-1a*, respectivamente associados à constituição estrutural do citoesqueleto e à ligação do GTP ao aminoacil-tRNA, para serem utilizados nas análises posteriores. No terceiro experimento foram utilizadas sementes com dois níveis de P, dois níveis de P na solução nutritiva e sete épocas de coleta, sendo avaliada a expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* por PCR em tempo real. O alto P da semente aumentou a massa seca de parte aérea e de nódulos na média dos níveis de P na solução nutritiva aos 35 DAE. Os teores de P da semente não modificaram a expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* aos 2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação. O *Enod40* teve sua expressão aumentada após aplicação de P na solução nutritiva, sendo mais expresso em plantas oriundas de sementes com alto teor de P, mas na menor dose de P no substrato. Apesar do alto teor de P da semente ter aumentado a nodulação do feijoeiro, não foi detectado antecipação nos processos de nodulação e fixação de N₂, através da expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina*.

Palavras-chave: PCR em tempo real. Fixação biológica de nitrogênio. *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

Oliveira, Roselaine Sanchez da Silva de Oliveira. **Nodulation and expression of genes *Enod40* and *leghemoglobin* in common bean plants at different phosphorus levels in the seed and the substrate.** 2011. 44p. Dissertation (Máster Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Seed enriched with P increased nodulation and N accumulation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants particularly at low levels of P availability in the substrate. The hypothesis that seeds enriched with P can advance the process of nodulation and biological N₂ fixation is presented. The objective of this study was to evaluate the effect of seed P concentration on the beginning of the processes of nodulation and N₂ fixation, at different levels of the P in the substrate, through the analysis of the expression of genes *Enod40* and *leghemoglobin* by the technique of Real time PCR. Three experiments were carried out in greenhouse in Embrapa Agrobiologia. The first experiment had the objective to adapt the P level in the substrate, to enable the demonstration of the effect of seed P. The experiment was constituted of two seed P concentrations (low and high), five levels of P in nutrient solution applied to substrate (0, 125, 250, 500 and 1000 µM of P) and two dates of harvest (30 and 43 days after emergence - DAE). The high seed P increased the nodulation, N accumulation and shoot dry matter at the levels of 0, 125 and 250 µM of P, at 30 and 43 DAE. In the second experiment, the efficiency of primers was evaluated through the technique of real time PCR. It comprised two seed P concentrations combined with two P levels in nutrient solution applied to substrate (125 and 500 µM of P) at three dates of harvest. The high seed P increased the nodule mass at 10 DAE at the level of 150 µM of P. Two reference genes, *PvAct2* and *PvEF-1a*, respectively associated with the structural constitution of the cytoskeleton and the binding of GTP to aminoacyl-tRNA, were selected to be used in further analyses. In the third experiment two seed P levels, two levels of P in nutrient solution and seven dates of harvest were used, and the expression of the genes *Enod40* and *leghemoglobin* was evaluated by real time PCR. The high seed P concentration increased the shoot and nodule dry matter in the average of P levels in nutrient solution at 30 DAE. Seed P concentration did not affect the expression of the genes *Enod40* and *leghemoglobin* at 2, 4, 6 and 8 DAE. The *Enod40* had its expression increased after application of P in nutrient solution, and was more expressed in plants originating from seeds with high P but in the lower P level in the substrate. Although the high seed P concentration increased the nodulation of common bean, the anticipation of processes of nodulation and N₂ fixation was not identified by the expression of the genes *Enod40* and *leghemoglobin*.

Key words: *Real time PCR*. Biological nitrogen fixation. *Phaseolus vulgaris*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Teor de P e peso de 100 sementes nas sementes de duas cultivares de feijoeiro com teores contrastantes de P utilizadas nos três experimentos na casa de vegetação..... 11
- Tabela 2.** Solução nutritiva de Norris, modificada por Gruzman & Döbereiner (1968), com as variações nas concentrações de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 para obtenção dos diferentes níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato..... 12
- Tabela 5.** Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primer) utilizados no experimento III nas reações de PCR e PCR em tempo real para avaliação da estabilidade de genes referência (controle) e expressão dos genes Enod40 e leghemoglobina em nódulos de feijão cultivar Manteigão..... 17
- Tabela 6.** Razão raiz:parte aérea e massa unitária de nódulos, de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência)..... 20
- Tabela 7.** Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (125 e 500 μM), aos 3 e 5 dias após emergência (DAE)..... 22
- Tabela 8.** Massa seca de nódulo, número de nódulo, razão raiz:parte aérea e massa unitária de nódulos, de plantas de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (10 e 15 dias após emergência)..... 22
- Tabela 9.** Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (125 e 500 μM), em duas épocas de coleta (10 e 15 dias após emergência)..... 23
- Tabela 10** Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Manteigão, provenientes de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, aos 6 dias após inoculação..... 33
- Tabela 11** Massa seca de parte aérea e raiz de plantas, nódulo e número de nódulos de plantas de feijoeiro cv. Manteigão, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P no substrato, aos 35 dias após inoculação..... 34
- Tabela 12** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea, número de nódulos, razão raiz:parte aérea,, massa de 1 aos 30 DAE..... 43
- Tabela 13** Análise de variância de teor de N da raiz e parte aérea aos 30 DAE..... 43
- Tabela 14** Análise de variância de teor de N da raiz e parte aérea aos 43 DAE..... 43
- Tabela 15** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 3 DAE..... 44
- Tabela 16** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 5 DAE..... 44
- Tabela 17** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 10 DAE..... 44
- Tabela 18** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 15 DAE..... 44
- Tabela 19** Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea, número de nódulos, razão raiz:parte aérea, massa de 1 nódulo aos 25 DAE..... 44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca de nódulos de plantas de feijoeiro cv carioca, provenientes de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P no substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência); quadrados representam as médias experimentais, as linhas o modelo polinomial de 2º grau ajustados aos dados, e as barras verticais a diferença mínima significativa pelo teste de Duncan a 5% que comparam teor de P na semente dentro de cada nível de P no substrato..... 19
- Figura 2.** Acúmulo de N na parte aérea de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, proveniente de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência); quadrados representam as médias experimentais, as linhas o modelo polinomial de 2º grau ajustados aos dados, e as barras verticais a diferença mínima significativa pelo teste de Duncan a 5% que comparam teor de P na semente dentro de cada nível de P no substrato..... 21
- Figura 3.** Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência, através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijão cultivar Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P em dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos 3 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular 1: EF1-AlphaA alto P na semente; 2: PvActin alto P na semente; 3: PvTubulin alto P na semente; 4: PvEF1a baixo P na semente; 5: PvActin baixo P na semente; 6: PvTubulin baixo P na semente..... 24
- Figura 4** Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência, através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos (A) 5 dias após emergência, (B) aos 15 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular; 1: PvTubulin alto P na semente; 2: PvTubulin baixo P na semente; 3: PvActin alto P na semente; 4: PvActin Baixo P na semente..... 24
- Figura 5.** Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos 10 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular; 1: PvTubulin alto P na semente, alto P no substrato; 2: PvTubulin alto P na semente, baixo P no substrato; 3: PvTubulin baixo P na semente, alto P no substrato; 4: PvTubulin baixo P na semente, baixo P no substrato; 5: PvActin alto P na semente, alto P no substrato. 6: PvActin alto P na semente, baixo P no substrato; 7: PvActin baixo P na semente, alto P no substrato. 8: PvActin baixo P na semente, baixo P no substrato..... 25
- Figura 6.** Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência. Confirmação de produto único de amplificação para cada um dos genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação dos tamanhos esperados para os amplificons em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originados de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos 3 dias após emergência. (A) Alto P na semente. 1: PvGAPDH1; 2: PvGAPDH2; 3: PvUBQ9; 4: PvUBQ10; 5: PvACT2; 6: PvYLS8; 7: PvPolyp; 8: PvEF-1Alpha; 9: PvTracBP; 10: PvSAND. (B) Baixo P na semente. 1:

PvGAPDH1; 2: PvGAPDH2; 3: PvUBQ9; 4: PvUBQ10; 5: PvACT2; 6: PvYLS8; 7: PvPolyp; 8: PvEF-1Alpha; 9: PvTracBP; 10: PvSAND..... 26

Figura 7. Confirmação dos amplificons e especificidade dos iniciadores para os genes referência. (A) Confirmação de produto único de amplificação para cada um dos genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% (1) Alto P EFAct2; (2) Baixo P EFAct2; (3) Alto P EF1Alpha (4) Baixo P, EF1Alpha. (B) Confirmação da especificidade das reações de PCR em tempo real através da curva de dissociação para os genes normalizadores EFAct2 e EF1-Alpha em nódulos de feijão cv. Manteigão originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos 2 dias após inoculação..... 27

Figura 8. Classificação dos genes candidatos GAPDH, ACT2 e EF1a com base nos valores de estabilidade de expressão (M) determinada pelo programa geNORM em 24 amostras de cDNA de nódulos de feijoeiro cv. Manteigão testados em duas condições experimentais (alto P e baixo P na semente). Os genes com expressão mais constitutiva estão indicados à direita do gráfico, os que apresentam expressão menos estável, estão ao lado esquerdo..... 28

Figura 9. Confirmação dos amplificons e especificidade dos iniciadores para os genes Alvos. (A) Confirmação de produto único de amplificação para cada um dos genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% (1) Alto P PvEnod40; (2) Baixo P PvEnod40; (3) Alto P PvLeg (4) Baixo P, PvLeg. (B) Confirmação da especificidade das reações de PCR em tempo real através da curva de dissociação para os genes normalizadores PvEnod40 e PvLeg em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 µM de P) aos 2 dias após inoculação..... 29

Figura 10. Expressão relativa do gene Enod40 em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, em 4 épocas de coleta (2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação). Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Expressão relativa do gene Enod40 em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (P1 e P2, respectivamente 125 µM e 500 µM de P) aos 10 dias após a inoculação. Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. Expressão relativa do gene Leg em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P em 4 épocas de coleta (2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação). Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P..... 32

Figura 13. Expressão relativa do gene Leg em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P em solução nutritiva aplicada ao substrato (P1 e P2, respectivamente 125 μ M e 500 μ M de P), aos 10 dias após a inoculação). Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P..... 33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos Gerais da Cultura do Feijoeiro	3
2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio	4
2.3. O Fósforo na Planta.....	5
2.4. Efeito do Fósforo na Fixação Biológica de Nitrogênio	6
2.5. Processo de Infecção e Nodulação	7
2.6. PCR em Tempo Real.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Experimento I - Nodulação do Feijoeiro Afetado pelo Teor de Fósforo na Semente sob Diferentes Níveis de Fósforo no Substrato.....	11
3.2. Experimento II - Validação dos Genes Normalizadores Através da RT-PCR em Nódulos de Feijão	12
3.2.1. Condições experimentais	12
3.2.2. Análise da expressão gênica por PCR	13
3.3. Avaliação da Expressão dos Genes ENOD40 e Leghemoglobina em Feijoeiro	16
3.3.1. Condições experimentais	16
3.3.2. Análise da expressão gênica por PCR e PCR em tempo real	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Nodulação do Feijoeiro Afetado pelo Teor de Fósforo na Semente sob Diferentes Níveis de Fósforo no Substrato - Experimento I	18
4.2. Validação dos Genes Normalizadores Através da RT-PCR em Nódulos de Feijão - Experimento II.....	21
4.2.1. Produção de biomassa	21
4.2.2. Seleção de genes referência para análise de PCR em tempo real.....	23
4.3. Avaliação da Expressão dos Genes ENOD40 e Leghemoglobina em Feijoeiro	26
4.3.1. Avaliação por PCR em tempo real dos genes referência	26
4.3.2. Validação dos iniciadores desenhados para os genes Enod40 e leghemoglobina ...	28
4.3.3. Expressão dos genes Enod 40 e leghemoglobina por PCR em tempo real.....	29
4.3.4. Produção de biomassa	33
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
7. ANEXOS.....	43

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa área cultivada de 4,2 milhões de hectares, com produção de 3,5 milhões de toneladas, o que implica em uma produtividade média de 849 kg ha⁻¹ (IBGE, 2010). Esta média de produtividade está muito abaixo do potencial produtivo da cultura, uma vez que em monocultivo sob alta tecnologia, tem se obtido em experimentos rendimentos em torno de 4.000 kg ha⁻¹ (Vieira et al., 1999).

O feijoeiro apresenta a capacidade de fixar nitrogênio (N₂) atmosférico quando em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Esta associação caracteriza-se pela formação de estruturas altamente especializadas denominadas nódulos, em cujo interior é sintetizado o complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela quebra da tripla ligação do N₂ e sua conversão a amônia (NH₃). O processo de fixação biológica de N₂ constitui um potencial biotecnológico capaz de substituir, total ou parcialmente, a adubação nitrogenada, possibilitando o aumento da produtividade e redução nos custos de produção, recuperação de áreas degradadas e aumento da fertilidade do solo, tornando-se uma importante ferramenta para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável.

As leguminosas quando em simbiose com rizóbio, têm seu crescimento bastante limitado em solos com baixa disponibilidade de fósforo (P), em função da alta demanda energética para redução do N₂ atmosférico e assimilação do N (Sa & Israel, 1991), situação agravada em função da baixa disponibilidade de P comum em solos tropicais. A relação entre a baixa disponibilidade de P e a fixação de N₂ ainda não está clara. Alguns estudos sugerem que a regulação ocorre no aparato fotossintético, afetando a produção e o fornecimento de carboidratos não estruturais para os nódulos (Gordon et al., 1997), enquanto outros estudos indicam que o P tem um efeito direto na atividade da nitrogenase e no metabolismo dos nódulos (Almeida et al., 2000).

Em experimentos em casa de vegetação, foi observado que o alto teor de P na semente aumentou a produção de matéria seca, a nodulação e a acumulação de N em plantas de feijoeiro, particularmente sob baixa disponibilidade de P no solo (Teixeira et al., 1999; Araujo et al., 2002). Como o suprimento limitado de P causa atrasos no desenvolvimento da nodulação no feijoeiro (Araújo & Teixeira, 2000), sementes com alto teor de P obtido via adubação foliar podem aumentar o crescimento, a nodulação e a acumulação de N do feijoeiro em estádios iniciais de crescimento, particularmente sob baixas doses de P aplicado ao solo.

Durante as diferentes etapas da simbiose entre leguminosas e rizóbios, diversos genes das plantas, que codificam proteínas chamadas nodulinas, são expressos nos nódulos. De acordo com o padrão de expressão, essas nodulinas são classificadas em precoces e tardias (Verma et al., 1992). As nodulinas precoces são expressas imediatamente após o contato do rizóbio com a raiz da planta e estão associados à invasão bacteriana e organogênese do nódulo. As nodulinas tardias são expressas em nódulos maduros e desempenham um papel no metabolismo do carbono e N e na manutenção ou senescência dos nódulos (Bergmann et al., 1983).

O *Enod40* pertence à classe das nodulinas precoces, sendo um dos principais genes estudados em resposta aos fatores *Nod* (lipoquitooligossacarídeo), devido à sua alta expressão durante os estágios iniciais da organogênese do nódulo (Verma et al., 1992). A leghemoglobina pertencente à classe das nodulinas tardias, e atua facilitando a difusão de O₂, possibilitando a síntese e o funcionamento da nitrogenase (Bergmann et al., 1983).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real é uma poderosa ferramenta no estudo da expressão gênica, permitindo uma alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e rápida análise dos dados (Ginzinger, 2002). Atualmente, esta técnica é um

dos métodos mais utilizados em estudos biológicos, permitindo quantificar pequenas mudanças na expressão gênica, com resultados rápidos e confiáveis (Bustin, 2002).

A hipótese do trabalho é que sementes de feijoeiro com altos teores de P antecipam os processos de nodulação e fixação biológica de N_2 . Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do alto teor de P da semente sobre o desenvolvimento inicial da nodulação e da fixação de N_2 no feijoeiro, cultivado em substrato com diferentes níveis de P, através da análise da expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* através da PCR em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Cultura do Feijoeiro

Devido à sua ampla adaptação edafoclimática, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em diversificados sistemas de produção, em praticamente todo o território nacional e diferentes épocas de plantio. Considerado uma das principais fontes protéicas, por apresentar em sua constituição todos os aminoácidos essenciais, o feijão é um componente básico na cultura alimentar de aproximadamente 100 milhões de consumidores de baixo poder aquisitivo no mundo, cuja dieta é baseada em amido (CIAT, 1990). No Brasil, o feijão está presente no hábito alimentar de grande parte da população, e sua importância alimentar deve-se especialmente ao baixo custo deste alimento associado ao alto valor nutritivo de suas proteínas.

A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é uma leguminosa originária das Américas, tendo sido cultivada pelos indígenas pré-colombianos desde o Canadá até o Chile e Argentina (Embrapa, 2010). Dados mais recentes, com base em padrões eletroforéticos da faseolina, proteína mais abundante encontrada em sementes de feijão, sugerem a existência de três centros primários de diversidade genética: o mesoamericano, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; o sul dos Andes, que abrange desde o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina; e o norte dos Andes, que abrange a Colômbia e Venezuela até o norte do Peru (Embrapa, 2010).

No feijoeiro, a porção terminal da haste define dois hábitos de crescimento, o primeiro denominado de crescimento determinado, onde a emissão de flores e ramos cessa por ocasião da floração, e o segundo conhecido por indeterminado, caracterizando-se pelo processo de crescimento de ramos após a floração (Fanceli & Dourado Neto, 2007). Em função do grau e tipo de ramificação, os hábitos de crescimento podem ser agrupados em quatro tipos: Tipo I – plantas de crescimento determinado; Tipo II – plantas de crescimento indeterminado arbustivo; Tipo III – plantas de crescimento indeterminado prostrado; e Tipo IV – plantas de crescimento indeterminado trepador (Fanceli & Dourado Neto, 2007).

No ano de 2009, a produção brasileira de feijão foi de 3,5 milhões de toneladas em uma área de 4,2 milhões de hectares, o que implica em uma produtividade média de 849 kg ha⁻¹ (IBGE, 2010). Esta média de produtividade está muito abaixo do potencial produtivo da cultura, uma vez que, em monocultivo aliada à alta tecnologia, tem sido obtido em experimentos valores de cerca de 4.000 kg ha⁻¹ (Vieira et al., 1999). Os principais estados produtores são Paraná, Minas Gerais, Bahia, Goiás e São Paulo, sendo responsáveis por 65% da produção (IBGE, 2010). No período de 2000 a 2009, as exportações de feijão atingiram média anual de 9,5 mil toneladas, atingindo índices de 30,5 mil toneladas em 2007 e de 25 mil toneladas em 2009 (Chaves, 2010).

Considerando a diversidade fisiográfica do país e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de solo e clima, é possível explorar a cultura em três diferentes épocas. A primeira é a safra “das águas”, cujo cultivo é realizado entre os meses de agosto e novembro, com predominância na Região Sul, sendo a maior das três safras (Embrapa, 2010). A segunda safra é plantada entre janeiro e março e colhida entre abril e julho; e a terceira, cultivada entre julho e outubro e onde predomina o cultivo irrigado, tem produção concentrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia (Fuscaldi & Prado, 2005).

Os produtores de terceira safra são capitalizados e adotam o uso de tecnologia avançada, comercializando grandes quantidades e obtendo melhores preços, o que os torna menos sujeitos a ação de intermediários e especuladores (Fuscaldi & Prado, 2005). As regiões

de terceira safra apresentam produtividades médias bem mais elevadas, correspondendo com aproximadamente 22% da produção e 19,5% da área plantada (Fuscaldi & Prado, 2005). No entanto, grande parte da produção brasileira está ligada a pequenas e médias propriedades, em geral, produtores que utilizam mão de obra familiar com baixo nível tecnológico, sendo estes responsáveis por grande parte da produção nacional, mas com menores produtividades (Embrapa, 2010).

O acesso limitado a uma tecnologia de plantio e manejo adaptada ao pequeno e médio produtor é um aspecto que tem contribuído para obtenção de baixas produtividades do feijoeiro. Além disso, por ser uma cultura com exigências nutricionais relativamente elevadas, o produtor não dispõe de recursos para utilização de fertilizantes.

2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos elementos requeridos em maior quantidade pelos vegetais, sendo constituinte da estrutura de proteínas, ácidos nucléicos, clorofila e hormônios. A absorção de N pelos vegetais ocorre nas formas nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+). A maior parte do N da atmosfera é quimicamente inerte à temperatura ambiente, representando 78% dos gases da atmosfera terrestre. Sua fórmula molecular é constituída por dois átomos de N unidos por uma ligação tripla extremamente estável, tornando incapaz a sua absorção e assimilação pelos organismos eucariontes. Para que ocorra a transformação do N_2 em formas disponíveis para os vegetais, é necessário o fornecimento de temperatura e pressão ou através da presença de um sistema enzimático apropriado.

Na indústria a fixação de N é realizada pelo processo Haber-Bosh, sendo necessárias temperaturas (400 °C) e pressões elevadas (107 pascal) (Moreira & Siqueira, 2006). Dos fertilizantes minerais, os que possuem N são os mais caros e que consomem mais energia em sua produção, custando para agricultura cerca de US\$ 45 bilhões anualmente (Ladha & Reddy, 2003).

A fixação biológica de N_2 (FBN) é restrita aos organismos procariontes, denominados fixadores de N ou diazotróficos, sendo capazes de reduzir o N_2 à amônia em condições normais de temperatura e pressão. Através do complexo enzimático denominado nitrogenase, ocorre a hidrólise de 16 adenosina tri-fosfato (ATP) e 8 elétrons por molécula de N_2 fixado, sendo um dos processos metabólicos mais dispendiosos realizados pelas células (Reis et al., 2006). A incorporação do N_2 atmosférico através do processo biológico contribui com 65% do total do N fixado no planeta (Moreira & Siqueira, 2006).

O feijoeiro tem a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de N_2 , garantindo parte de suas exigências em N. Considerado um hospedeiro promíscuo com relação ao rizóbio, o feijoeiro pode formar associação com diferentes graus de eficiência com uma grande diversidade de rizóbios, podendo nodular com pelo menos 12 espécies de rizóbio (Straliotto & Teixeira, 2000).

Dentre as leguminosas de grão, o feijoeiro é considerado uma das culturas com menor eficiência na FBN (Moreira & Siqueira, 2006). Segundo Straliotto & Rumjaneck (1999), diversos resultados experimentais mostraram a baixa capacidade da planta em atingir seu potencial produtivo quando dependentes apenas da FBN. Apesar desta constatação, vários estudos indicam que há possibilidade da substituição da adubação nitrogenada pela FBN (Romanini Junior et al., 2007), e a possibilidade de se obter rendimentos entre 1.500 a 2.000 kg ha⁻¹ em feijão sob FBN (Straliotto & Teixeira, 2000).

O feijoeiro apresenta uma grande variabilidade na capacidade de nodulação e fixação biológica de N_2 entre os diferentes genótipos (Araújo et al., 1998). Estudo realizado com 9 linhagens mostrou uma diferença significativa na FBN, que variou de 18 a 51 kg ha⁻¹, sendo

as plantas que fixavam mais N as que nodulavam rapidamente após a germinação das sementes (nodulação precoce) (Cassini & Franco, 2006).

Vários fatores interferem na eficiência do estabelecimento da simbiose, acarretando variabilidade de resposta à nodulação e FBN do feijoeiro. Alguns fatores podem ser relacionados a características intrínsecas da espécie hospedeira, ou extrínsecos envolvendo populações nativas de rizóbio e fatores climáticos e edáficos (Straliotto & Rumjaneck, 1999). A temperatura pode afetar diferentes estágios da infecção, formação e funcionamento do nódulo, sendo a simbiose no feijoeiro drasticamente limitada em temperatura média superior a 34 °C (Moreira & Siqueira, 2006). Na maioria das bactérias do gênero *Rhizobium*, a grande parte dos genes da nodulação e fixação de N₂ estão localizados em plasmídeo de elevado peso molecular denominado plasmídeo Sym (pSym), que pode ser perdido ou sofrer rearranjos genéticos modificando a expressão desses genes (Hungria, 1994). Atualmente, o inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil é produzido com uma espécie de rizóbio adaptada aos solos de clima tropical, o *Rhizobium tropici*, resistente a altas temperaturas, acidez do solo e com alta competitividade (Straliotto & Rumjaneck, 1999).

Na cultura do feijoeiro, o nódulo começa a ter atividade 15 a 20 dias após a emergência da planta, havendo um rápido declínio nas taxas de FBN durante a fase de enchimento dos grãos (Cassini & Franco, 2006), ou seja, quando a planta mais necessita do suprimento nitrogenado. Sendo assim, a antecipação da nodulação e do processo de fixação de N₂ prolongaria a atividade nodular. Além disso, considerando que o feijoeiro é cultivado principalmente por pequenos produtores, a utilização de técnicas que permitam antecipar o início da nodulação e FBN poderá corresponder a aumentos significativos no rendimento dos grãos.

2.3. O Fósforo na Planta

O P é um dos nutrientes mais absorvidos pelas plantas, participando com cerca de 2 g kg⁻¹ do peso da matéria seca, na constituição de ATP, RNA e DNA, desempenhando um papel fundamental no fornecimento e armazenamento de energia, respiração e fotossíntese (Schahtman et al., 1998). O P está envolvido na estabilização e composição das membranas, ativação e inativação enzimática, reações de oxirredução, participação no processo de transdução de sinais, além do processo de fixação biológica de N₂ (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

Cerca de 75% do fosfato é armazenado nos vacúolos, de onde é mobilizado quando o fornecimento é limitado; os 25% restantes encontra-se no citoplasma e nas organelas celulares, em equilíbrio com os ciclos metabólicos (Schahtman et al., 1998). A compartimentalização deste elemento é de fundamental importância para regulação das vias metabólicas no citoplasma e cloroplastos. Na planta, apenas uma pequena parcela do P está envolvida no metabolismo: se o suprimento de P for adequado, grande parte do reservatório permanece não metabolizado sendo armazenado no vacúolo como ortofosfato; sob estresse de P, as reservas são exauridas, enquanto os níveis metabólicos praticamente não são afetados (Grant et al., 2001).

Embora o P possa ser absorvido nas formas H₂PO₄⁻ e HPO₄⁻², a sua absorção ocorre principalmente na sua forma oxidada, por intermédio de um transportador de HPO₄⁻² do tipo simporte. Posteriormente, é incorporado a uma variedade de compostos orgânicos incluindo açúcares fosfatados, fosfolipídios e nucleotídeos (Taiz & Zeiger, 2009).

Existem mais de 50 tipos de ésteres de fosfato formados a partir de açúcares de alcoóis, dos quais 10 aparecem em alta concentração nas células, como a glicose-6-P e P-gliceraldeído, e as coenzimas AMP, ADP, ATP e GTP (Furlani, 2004). Os fosfolípideos como a fosfatidil cotina, fosfatidil etanoladina, fosfatidil serina, encontra-se em várias partes da célula, como a membrana celular, a qual confere natureza lipídica (Malavolta et al., 1989).

O P pode alterar o desenvolvimento da planta, atuando como nutriente que estimula a produção de fitomassa, ou funcionando como sinal que regula mudanças na arquitetura radicular (López-Bucio et al., 2002). Sob deficiência de P, as raízes crescem proporcionalmente mais do que a parte aérea, em função da partição desequilibrada de matéria seca entre raiz e parte aérea, assim a demanda metabólica ao longo da via de transporte retira o P da rota de deslocamento e incorpora ao metabolismo das células das raízes (Fernandes & Souza, 2006).

O fosforo inorgânico (Pi) tem uma importante função na partição de carbono entre os cloroplastos e o citosol. Em cloroplastos isolados, um aumento na concentração de Pi no citosol estimula a fotossíntese, mais inibe drasticamente a incorporação de carbono fixado em amido (Furlani, 2004). Assim quando a disponibilidade deste nutriente é limitada, o crescimento é mais reduzido do que a taxa de fotossíntese (Cromer et al., 1993). A deficiência de P pode reduzir tanto a fotossíntese como a respiração, se a respiração se reduzir mais que a fotossíntese os carboidratos se acumulam, deixando as folhas com coloração verde escura (Grant et al., 2001). A deficiência de P pode também reduzir a síntese de ácidos nucleicos e de proteína, reduzindo a acumulação de compostos nitrogenados solúveis no tecido (Grant et al., 2001).

Com deficiência de P, as plantas apresentam número reduzido de frutos e sementes, atraso no florescimento e tamanho reduzido da planta, aumento no conteúdo de carboidratos (Malavolta et al., 1989). Os sintomas de deficiência incluem ainda diminuição do índice de área foliar, além do aumento da densidade radicular nas camadas superficiais do solo (Gutierrez-Boem & Thomas, 1998).

Um dos mecanismos sugeridos para aumentar a eficiência de P nos tecidos seria o aumento deste nutriente na semente (Lynch & Beebe, 1995). O aumento da concentração de P na semente pode ser usado para melhorar o suprimento de P no início do ciclo, aumentando assim o vigor e subsequentemente o crescimento da planta.

2.4. Efeito do Fósforo na Fixação Biológica de Nitrogênio

A deficiência da nutrição fosfatada é um fator limitante na eficiência da nodulação e na fixação de N₂ (Christiansen & Graham, 2002). A quantidade deste elemento nos nódulos representa cerca de 1,5% do P total da planta (Schulze et al., 2006). As leguminosas quando em simbiose com bactérias fixadoras de N₂ têm o seu crescimento afetado em solos com baixa disponibilidade de P (Reis et al., 2006).

Segundo Gordon et al. (1997), a relação entre a baixa disponibilidade do P e a fixação de N₂ ainda não está clara. Uma baixa e limitada disponibilidade de P eventualmente reduz a fixação simbiótica de N₂ por afetar o crescimento da planta hospedeira, além de afetar diretamente o crescimento e funcionamento do nódulo (Chaudhary & Fujita, 1998). Alguns estudos sugerem que a regulação ocorre no aparato fotossintético, afetando a produção e o fornecimento de carboidratos não estruturais para os nódulos (Gordon et al., 1997), enquanto outros estudos indicam que o suprimento limitado de P tem um efeito direto na atividade da nitrogenase nos nódulos (Almeida et al., 2000).

A enzima nitrogenase é composta por duas unidades, uma ferro-proteína que coleta força redutora e energia e uma ferro-molibdênio-proteína que coleta e reduz o substrato (Moreira & Siqueira, 2006). Para reduzir uma molécula de N₂ a NH₃ são necessários 8 elétrons, portanto 16 ATPs (Taiz & Zieger, 2009). Esta redução do N₂ pela nitrogenase consome cerca de 60% a 80% do ATP sintetizado no nódulo (Twary & Heichel, 1991). A sacarose formada através da fotossíntese é a principal fonte de energia, suprimindo a demanda energética dos bacteróides ativos.

O amônio (NH_4^+) produzido é assimilado no ciclo GS/GOGAT, depois é liberado no citossol da planta. O primeiro passo é a catalise pela glutamina sintetase (GS), que usa ATP convertendo amônio até glutamina, em seguida a glutamina é convertido em glutamato pela glutamato sintase (GOGAT) (Cullimore & Bennett, 1998). Este processo e a subsequente transformação em aminoácidos e ureídeos, que acontecem na fração vegetal do nódulo, são ambos consumidores de energia (Olivera et al., 2004).

A deficiência de P tem um impacto negativo no status energético dos nódulos das leguminosas (Sa & Israel, 1991), sendo um fator limitante na eficiência da nodulação e na fixação de nitrogênio (Christiansen & Graham, 2002), reduzindo o abastecimento de carboidrato que são normalmente limitados no início da nodulação, desenvolvimento e crescimento e na atividade da nitrogenase (Schulze et al., 2006).

A alta disponibilidade de P favorece o crescimento da planta e pode alocar mais carbono para raízes e nódulos, com um incremento no número e tamanho de nódulos, na atividade da nitrogenase e na taxa de fixação de N_2 em feijão (Vadez et al., 1999). A biomassa do nódulo está fortemente correlacionada com a disponibilidade de P nas plantas com redução principalmente no tamanho do nódulo sob baixo suprimento de P (Ribet & Drevon, 1995).

Sendo assim, considerando que o suprimento limitado de P causa atrasos no desenvolvimento da nodulação (Araújo & Teixeira, 2000), a produção de sementes com maiores teores de P pode aumentar a FBN, podendo aumentar o crescimento e produção em solos com baixa disponibilidade de P.

2.5. Processo de Infecção e Nodulação

As bactérias do solo coletivamente denominadas rizóbios são capazes de associar-se simbioticamente com espécies de leguminosas, formando estruturas altamente especializadas denominadas nódulos. Este processo é complexo e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria (Hungria, 1994). As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor necessário aos processos de fixação biológica de N_2 , enquanto as mudanças fisiológicas na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria, 1994).

O processo de formação do nódulo ocorre durante a associação simbiótica, sendo controlada pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira. Os genes específicos da planta envolvidos na nodulação são denominados nodulinas (Nod), enquanto os genes dos rizóbios são conhecidos como nod, nol e noe (Heidstra & Bisseling, 1996). Na bactéria esses genes estão localizados em plasmídeo (pSym) e no cromossomo (Hungria, 1994). A expressão dos genes bacterianos é regulada por um ativador transcricional endógeno *NodD*, pertencente a família LysR, cuja indução se dá através da ação de compostos fenólicos (flavonóides) (Krishnan et al., 1995). A proteína *NodD*, na presença de flavonóide, se liga a uma sequência de DNA chamada nod-box encontrada na região promotora dos genes bacterianos (nod, noe e nol) (Fisher et al., 1988). A molécula formada pelo produto dos genes nodABC, lipo-quitto-oligossacarídeo, foi identificada como fator Nod. Os fatores Nod provocam alterações morfológicas nas raízes, como encurvamento do pêlo radicular, alcalinização do meio extracelular, oscilações na concentração de Ca^{+2} , formação do cordão de infecção e a multiplicação das células corticais que formam os primórdios nodulares (Loh & Stacey, 2003).

Os processos de infecção e organogênese do nódulo ocorrem simultaneamente durante a formação do nódulo radicular (Taiz & Zeiger, 2009). A planta hospedeira libera sinais que são responsáveis pela transcrição de genes do rizóbio essenciais à nodulação (Hungria et al., 1997). Os rizóbios que estão ligados aos pêlos radiculares liberam os fatores Nod, que

induzem um pronunciado enrolamento do pêlo radicular (Taiz & Zeiger, 2009). Em *P. vulgaris*, os pêlos radiculares em desenvolvimento são deformados após 4 h a exposição aos fatores Nod (Cardenas et al., 2006). A invaginação da parede celular do pêlo radicular permite a entrada das células bacterianas nas raízes. Uma extensão interna da membrana plasmática é produzida pela fusão de vesículas derivadas do complexo de Golgi no local da infecção, o canal cresce no ápice pela fusão de vesículas secretoras na extremidade do tubo (Taiz & Zeiger, 2009). Durante as diferentes etapas da simbiose diversos genes da plantas, chamado genes nodulinas, são especificamente expressos nos nódulos (Oldroyd & Downie, 2004).

De acordo com o padrão de expressão as nodulinas são classificadas em precoces e tardias (Moreira & Siqueira, 2006). As nodulinas precoces são expressas imediatamente após o contato com rizóbio e estão associados à invasão bacteriana e organogênese do nódulo. São proteínas envolvidas na deformação e despolarização potencial na membrana do pêlo radicular, no processo de infecção do rizóbio e nos aspectos estruturas da ontogenia do nódulo (Gloude mans & Bisseling, 1989). As tardias são expressas em nódulos maduros e desempenham um papel no metabolismo do carbono e nitrogênio e na manutenção ou senescência dos nódulos (Bergmann et al., 1983). A expressão das nodulinas precoces está relacionada com vários aspectos funcionais do nódulo, sendo correlacionada com o início da fixação de N₂. As nodulinas tardias incluem enzimas envolvidas na assimilação do N (uricase II, glutamina sintetase), metabolismo do carbono como a sacarose sintase, anidrase carbônica, PEPC e proteínas de transporte de O₂ (Kavroulakis et al., 2000).

O *Enod40* é um dos principais marcadores funcionais expressos no início da organogênese do nódulo (Vijn et al., 1995). Sua expressão é induzida no periciclo antes da divisão das células do córtex que originam o primórdio nodular (Yang et al., 1993). Nas fases posteriores do desenvolvimento do nódulo indeterminado, esse gene é expresso no meristema e na zona de infecção adjacente ao meristema (Fang & Hirsch, 1998). A intensidade da expressão diminui nas partes mais antigas do nódulo, e a redução da expressão coincide com o início da acumulação de amiloplastos nas células infectadas (Mylona et al., 1995).

O tempo necessário para o aparecimento do mRNA de *Enod40* pode variar de acordo com a planta hospedeira. Em raízes de *Medicago sativa* inoculadas com *Sinorhizobium meliloti*, o mRNA foi detectado nas células do periciclo 3 h após a infecção e portanto, antes que as células corticais começassem a se dividir, persistindo nos primórdios do nódulo e nos nódulos (Cooper e Long, 1994). A divisão das células corticais teve início em torno de 20 horas após inoculação. Posteriormente, *MsENOD40* foi expresso nas células corticais em divisão que compõem o primórdio (Cooper e Long, 1994).

A expressão do gene *Enod40* não é restrita aos nódulos. Transcritos já foram detectados em tecidos meristemáticos não simbióticos, como raízes laterais, folhas jovens, primórdios das estípulas, caule, células radiculares procambiais e tecidos embrionários (Flemetakis et al., 2000). Genes homólogos também foram identificados em espécies não leguminosas, como tabaco (Matvienko et al., 1996) e arroz (Kouchi et al., 1999), indicando um papel mais geral nos vegetais. A superexpressão desse gene levou à aceleração da nodulação, enquanto que seu silenciamento prejudicou o desenvolvimento do nódulo, levando a formação de nódulos defeituosos (Charon et al., 1999). A inibição da expressão de *Enod40* de *Lotus japonicus* (*LjENOD40*) por RNA interferente (RNAi) provocou uma forte redução no número de nódulos, mas a infecção bacteriana do pêlo radicular não foi afetada (Kumagai et al., 2006).

Durante o crescimento, a planta depende do oxigênio (O₂) no nódulo, e uma concentração mínima é necessária para dar suporte à respiração aeróbica e à síntese de ATP, para suprir a alta demanda energética da nitrogenase. Entretanto, quando está presente em alta concentração, o O₂ pode levar ao dano irreversível da nitrogenase (Marchal & Vanderleyden, 2000). A solução para este aparente paradoxo é manter baixa concentração de O₂ em torno da

nitrogenase ao mesmo tempo em que grandes quantidades de O₂ devem ser fornecidas para os sítios da respiração (Marchal & Vanderleyden, 2000).

Uma das principais proteínas, e possivelmente a melhor caracterizada nos nódulos, é a leghemoglobina, pertencente à classe das nodulinas tardias, que se ligam reversivelmente ao oxigênio (Appleby et al., 1992). Esta proteína atua facilitando a difusão do O₂ para a respiração e a fosforilação oxidativa do bacteróide, mantendo a sua concentração em níveis baixos para impedir a inativação da nitrogenase (Appleby et al., 1992). As hemoglobinas de espécies leguminosas só foram detectadas nos tecidos infectados dos nódulos das raízes (Appleby et al., 1992). Esta proteína está presente no citoplasma de células infectadas e sua concentração varia de 3-5 mM, maior do que toda a concentração de O₂ livre (5-60 nM) (Hunt & Layzell, 1993).

O oxigênio reprime a expressão da nitrogenase ou inativa quando sintetizada ou em funcionamento e por este motivo, a fixação de N₂ está diretamente associada ao teor de leghemoglobina nos nódulos (Reis et al., 2006). A síntese da nitrogenase é dependente desta proteína, sendo assim, os eventos ocorrem na seguinte ordem: proliferação do bacteróide e aumento da demanda de O₂, causando uma condição microaerófila e conseqüentemente estímulo do rizóbio à síntese da porção heme; o grupo heme é transportado até o citoplasma do hospedeiro, onde será unido à porção globina, sintetizada no retículo endoplasmático do hospedeiro (Verma et al., 1979).

Durante a nodulação, vários genes do hospedeiro são expressos, indicando sua importância para o estabelecimento da simbiose entre a planta e o rizóbio. Devido a sua alta expressão durante a fixação simbiótica de N₂, os genes *Enod40* e *leghemoglobina* foram selecionados no presente trabalho como marcadores funcionais para avaliar o efeito do aumento do teor de P na semente e no substrato sobre o processo de nodulação e fixação de N₂. Considerando a importância do P no processo de fixação de N₂, o uso de sementes com alto teor de P possibilitaria um aumento da disponibilidade deste nutriente nos estágios iniciais da nodulação e da formação do nódulo, quando as plantas dependem basicamente das reservas contidas nos cotilédones.

2.6. PCR em Tempo Real

O estudo da expressão gênica requer a precisa quantificação de transcritos nas diferentes condições experimentais analisadas, e neste sentido, vários métodos têm sido desenvolvidos, tais como Northern blot, cDNA-AFLP e RT-PCR (Artico et al., 2010). Entretanto, estas metodologias permitem apenas uma análise qualitativa ou semi-quantitativa da expressão gênica (Bustin, 2002). Nos últimos anos, a transcrição reversa (RT) seguida pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) tem se tornado uma alternativa para quantificação da expressão, devido à sensibilidade, especificidade, boa reprodutibilidade e rápida análise dos dados (Pfaffl, 2004). Nesta metodologia, o estudo da expressão gênica é acompanhado pelos métodos de análise absoluto e relativo (Bustin, 2002). A amplificação relativa vem sendo freqüentemente utilizada, o que permite a comparação entre transcritos nas diferentes condições experimentais avaliadas (Stolf-Moreira et al., 2010). Entretanto estes resultados estão associados à expressão de um controle endógeno, que vai normalizar as variações nas amostras resultantes das alterações inespecíficas nos protocolos utilizados para extração e isolamento de RNA, etapas da transcriptase reversa, assim como a eficiência de amplificação (Gilsbach et al., 2006).

Para um gene ser validado como controle endógeno, sua expressão não deve ser alterada nas diferentes amostras, tecidos, estádios fenológicos e condições experimentais (Al-Bader & Al-Sarraf, 2005). Alguns genes normalizadores normalmente utilizados em experimentos de PCR em tempo real são freqüentemente descritos em literatura, destacando-se gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 18S do RNA ribossomal (18S rRNA),

beta tubulina(β -Tub), alfa tubulina (α -Tub), poliubiquitina (UBQ) e o fator de alongamento 1-a (EF1-a) (Artico et al., 2010). Esses genes utilizados como controle, em muitos casos, têm sido usados em ensaios, na suposição de que seriam constitutivamente expressos em função do seu papel nos processos celulares básicos. No entanto, nem todos os genes mostraram expressão constitutiva em todas as condições testadas, especialmente quando analisados por PCR em tempo real (Czechowski et al., 2005). Por este motivo, Jain et al. (2006) recomendaram que os genes constitutivos devem ser validados para cada condição experimental, antes de seu uso como controle interno nos ensaios de PCR em tempo real.

Como esses genes podem apresentar tais variações, é necessário o uso de estratégia para avaliar normalizadores adequados às condições avaliadas. Neste sentido, alguns programas foram desenvolvidos para avaliar a estabilidade da expressão dos diferentes genes normalizadores candidatos (Vandesompele et al., 2002). Alguns algoritmos e softwares foram empregados para avaliação dos controles endógenos, tais como geNorm, General Pattern Recognition, BestKeeper e Normfinder (Vandesompele et al., 2002). O programa geNorm determina o gene candidato mais estável, pela eliminação gradual em um conjunto de genes testado; a estabilidade do gene é dada por um valor M, genes com menor valor M apresentam expressão mais estável (Vandesompele et al., 2002). Já o *NormFinder* calcula a variação intra-grupo e inter-grupo, onde os grupos são definidos como as diferentes condições experimentais. O fator de normalização do gene é calculado e este gene é classificado em escala decrescente de acordo com sua estabilidade (Endersen et al., 2004).

A avaliação da expressão gênica utilizando a PCR em tempo real necessita de genes que possam ser utilizados como normalizadores (referência) para as diferentes condições experimentais. No caso do feijoeiro, ainda não há um grande número de genes referência caracterizados. Desta forma, houve a necessidade da seleção e validação de genes de referência para nossas condições avaliadas, antes dos experimentos com os genes alvos (*Enod40* e *leghemoglobina*). Desse modo, foi comparada a expressão de 14 genes constitutivos frequentemente descritos em literatura nas análises de Northern blot e RT-PCR, para as atuais condições experimentais, através dos programas GeNorm e normFinder.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia – RJ, em 2009 e 2010. O Experimento I teve o objetivo de ajustar os níveis de P no substrato de modo a permitir a adequada expressão do efeito do P na semente, uma vez que este efeito é dependente da disponibilidade de P no substrato. No experimento II foi comparada a expressão de 14 genes candidatos através de ensaios de PCR, selecionados a partir de sua similaridade com genes normalizadores de *Arabidopsis thaliana*, para serem utilizados como controle em reações de PCR em tempo real. No experimento III foi avaliada a eficiência e estabilidade dos genes normalizadores previamente selecionados e a expressão dos genes alvos, *Enod40* e *leghemoglobina* por PCR em tempo real.

3.1. Experimento I - Nodulação do Feijoeiro Afetado pelo Teor de Fósforo na Semente sob Diferentes Níveis de Fósforo no Substrato

O experimento foi conduzido entre junho e agosto de 2009. O substrato utilizado foi vermiculita e areia (2:1 v/v) esterilizado três vezes em autoclave a 120 °C por 1 hora e acondicionado em vasos plásticos de 1 L de capacidade. As sementes utilizadas foram obtidas em experimento de campo destinado à produção de sementes de cultivares com maiores teores de P e Mo através da adubação foliar (Kubota, 2006), estando disponíveis no banco de sementes da Embrapa Agrobiologia. Foram utilizadas sementes da cultivar Carioca, que apresenta grão bege com estrias marrons e hábito de crescimento indeterminado prostrado (Tipo III) (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de P e peso de 100 sementes nas sementes de duas cultivares de feijoeiro com teores contrastantes de P utilizadas nos três experimentos na casa de vegetação.

Cultivar	Teor de P	Teor de P (mg g ⁻¹)	Peso de 100 sementes (g)
Manteigão	Alto	4,30	43,6
Manteigão	Baixo	2,88	43,8
Carioca	Alto	4,27	23,1
Carioca	Baixo	2,68	23,7

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x5x2, constituído por dois teores de P na semente (baixo e alto teor de P), cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada no substrato (0, 125, 250, 500 e 1000 µM de P) e duas épocas de coleta (aos 30 e 43 dias após a emergência - DAE), com três repetições, totalizando 60 unidades experimentais.

Foram semeadas três sementes por vaso. No momento do plantio foi realizado a inoculação com 1 mL de cultura líquida de uma mesma mistura das estirpes CIAT899 (ou BR322) e PR-F81 (ou BR520) de *Rhizobium tropici* da coleção da Embrapa Agrobiologia, aplicada diretamente sobre a semente. Após a queda dos cotilédones, os vasos foram mantidos com a solução nutritiva de Norris (Tabela 2) isenta de N, sendo aplicados 150 mL da solução a cada cinco dias. O desbaste foi realizado 5 dias após emergência, permanecendo duas plantas por vaso.

Tabela 2. Solução nutritiva de Norris, modificada por Gruzman & Döbereiner (1968), com as variações nas concentrações de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 para obtenção dos diferentes níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato.

	Quantidade de sais			
	125 μM	250 μM	500 μM	1000 μM
	g kg^{-1}			
KCl				2,01
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				2,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$				2,00
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$				0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$				0,04
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				0,05
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$				0,004
H_3BO_3				0,57
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$				0,45
Ácido cítrico				0,65
	g kg^{-1}			
K_2HPO_4	0,25	0,49	0,98	1,96
KH_2PO_4	0,49	0,98	1,96	3,91

Em cada época de coleta, as plantas foram separadas em parte aérea, raiz e nódulos. Os nódulos foram separados das raízes e contados. O material foi seco em estufa de circulação de ar a 65 °C por 72 h e pesado. A parte aérea foi moída, sendo determinado o teor de N pelo método Kjeldahl (Malavolta et al., 1989). O conteúdo de N na parte aérea foi obtido pelo produto entre o teor de N e a massa seca.

Para os dados de biomassa e acumulação de N, foi realizada análise de variância para os dados de cada coleta isoladamente, avaliando os efeitos do teor de P na semente, do nível de P no substrato e de suas interações. Foi efetuada análise de regressão, ajustando-se os dados de biomassa e conteúdo de N na parte aérea a um modelo polinomial de 2º grau, considerando os níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato como variável independente. As médias dos teores de P das sementes dentro de cada nível de P no substrato foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

3.2. Experimento II - Validação dos Genes Normalizadores Através da RT-PCR em Nódulos de Feijão

3.2.1. Condições experimentais

O experimento foi conduzido em outubro de 2009, para validação através da RT-PCR dos genes normalizadores utilizados como controle (Tabelas 3 e 4). O substrato e as sementes foram os mesmos descritos no Experimento I.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com nove repetições, totalizando 144 unidades experimentais. Foram avaliados dois teores de P na semente (baixo e alto teor de P) na primeira coleta, e nas três demais coletas foram testados dois teores de P na semente (baixo e alto teor de P) em combinação com dois níveis de P na solução nutritiva

aplicada ao substrato (125 e 500 μM de P). As coletas foram realizadas aos 3, 5, 10 e 15 dias após a emergência.

Nos vasos destinados às duas primeiras coletas, foram semeadas quatro sementes por vaso e nas três últimas coletas foram semeadas três sementes por vaso. No momento do plantio, as sementes foram inoculadas como descrito no Experimento I. O desbaste foi realizado 5 dias após emergência, permanecendo três plantas por vaso nas duas primeiras coletas e duas plantas para as três últimas coletas. Das nove repetições de cada tratamento, seis vasos foram destinados à análise molecular (de modo a reduzir o efeito da variabilidade biológica e obter material suficiente para extração de RNA, este grupo foi subdividido em grupos de 3 repetições) e três vasos para biomassa.

Em cada época de coleta, as plantas foram separadas em parte aérea e sistema radicular. Nos vasos destinados para avaliação de biomassa, os nódulos foram separados das raízes e contados, já nos demais vasos, os nódulos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os nódulos e as raízes foram utilizados para extração do RNA, para avaliação dos genes de referência (controle) para os experimentos de PCR.

Para os dados de biomassa de parte aérea, raiz e nódulos, foi realizada análise de variância para os dados de cada coleta isoladamente, avaliando os efeitos do teor de P na semente, do nível de P no substrato e de suas interações. As médias dos teores de P das sementes dentro de cada nível de P no substrato foram comparadas pelo teste Duncan a 5%.

3.2.2. Análise da expressão gênica por PCR

a) Seleção de iniciadores

Para amplificação dos genes normalizadores, 14 genes normalmente utilizados em experimentos de *Northern blot* e PCR foram selecionados baseados em trabalhos da literatura. Os genes avaliados foram: *PvEF-1alpha* (fator de alongação Alfa), *PvUbiquitin* (ubiquitina), *Pvtubulin* (tubulina) e *PvActin* (actina).

Tabela 3. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados no experimento II nas reações de PCR para avaliação da estabilidade de genes referência (controle) em nódulos de feijão cultivar Carioca.

	Iniciadores	
	Notação em <i>Arabidopsis</i>	Função
<i>PvGAPDH1</i>	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase 1	Oxirredução na glicólise e gliconeogênese
<i>PvGAPDH2</i>	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase 2	Oxirredução na glicólise e gliconeogênese
<i>PvACT2</i>	Actina 2	Enzimas glicolíticas
EF-1Alpha	Fator de alongamento	Fator de alongamento
<i>PvSAND</i>	SAND	Proteína de degradação
<i>PvPolyp</i>	Polipirimidina	Proteína de ligação
<i>PvUBQ9</i>	Poliubiquitina 9	Proteína de degradação
<i>PvUBQ10</i>	Poliubiquitina 10	Proteína de degradação
<i>PvYLS8</i>	Proteína mitótica YLS8	Atividade catalítica
<i>PvUbiquitin</i>	Ubiquitina	Proteína de degradação
<i>PvActin</i>	Actina	Proteína estrutural do citoesqueleto
<i>PvTubulin</i>	Tubulina	Proteína estrutural do citoesqueleto
EF1-AlphaA	Fator de alongamento 1-Alfa	Ligação do GTP ao aminoacil-tRNA

Para identificação de genes normalizadores para utilização nos experimentos de PCR em tempo real, foram desenhados iniciadores para os genes *PvGAPDH1* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *PvGAPDH2* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *PvACT2* (actina 2), *PvEF-1a* (fator de alongação Alfa), *PvSAND* (processo de sinalização vacuolar em plantas), *PvPolyP* (polipirimidina), *PvTracBP*, *PvUBQ9* (ubiquitina 9), *PvUBQ10* (ubiquitina 10) (Tabela 3 e 4). Foram realizadas buscas no Banco de EST de feijão, utilizando genes previamente selecionados como normalizadores em *Arapdopsis* (Czechowski et al., 2005) as seqüências obtida para cada gene foram alinhadas utilizando o programa *ClustalW* (Larkin et al., 2007). A partir do alinhamento foi criada uma seqüência de consenso, e essa seqüência foi novamente comparada com o banco de dados de *Arabidopsis* utilizando o programa BLAST (Altschul et al., 1997) para confirmação do gene selecionado, e apenas seqüências que apresentaram alta homologia foram selecionados. No caso dos genes alvos, *Enod40* e *leghemoglobina*, a seqüência obtida no banco de dados foi utilizada para desenhar os iniciadores (primers). Todos os iniciadores para as análises de PCR em tempo real foram desenhados utilizando o programa *Primer Plus 3*, de forma a obter um fragmento amplificado entre 100 a 150 pares de base.

Tabela 4. Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados no experimento II nas reações de PCR para avaliação da estabilidade de genes referência (controle) em nódulos de feijão cultivar Carioca.

	Iniciadores	
	Forward/ Reverse	Referência
<i>PvGAPDH1</i>	TCCCCACTGTTGATGTTTCA TCAATTTGCCCTCTGATTCC	Este Trabalho
<i>PvGAPDH2</i>	TCACGCCATCACAGCTACTC CCAGTGCTGCTGGGAATAAT	Este Trabalho
<i>PvACT2</i>	AGTTCAGCCGTTGAGAAGAG ATGGATGGCTGGAACAGAAC	Este Trabalho
EF-1Alpha	AGGCTGATTGTGCTGTCCTT ACACCAAGGGTGAAAGCAAG	Este Trabalho
<i>PvSAND</i>	CTTGCTTGGTGGAACAGACA TTGCAAGATAGCACCAGCAG	Este Trabalho
<i>PvPolyp</i>	TATTCATCCAGCCAGTGCAG AACACGTCACAACCTGCATCC	Este Trabalho
<i>PvUBQ9</i>	CATCCTCAAGGAGCTCAAGG GCAGGACCCATAATTGTTGC	Este Trabalho
<i>PvUBQ10</i>	CTTGGTTTTGAGGCTTCGTG GCCTCTGTTGATCTGGTGGT	Este Trabalho
<i>PvYLS8</i>	CGATCTTGGTACTGGCAACA GGGAGCGATAACAAGACCAC	Kavar et al. (2008)
<i>PvUbiquitin</i>	GCTTCGTGGTGGAAATGCAGAT TCGCACCTTGGCAGACTACAA	Kavar et al. (2008)
<i>PvActin</i>	TGGCCGTACAACCTGGTATTG GCTCTGCAGATGTGGTGAAA	Kavar et al., (2008)
<i>PvTubulin</i>	GTACATGGCTTGCTGCTTGA TACAGCACGCTGCACCTTAG	Kavar et al., (2008)
EF1- AlphaA	AACTACCACCGGCCACTTGAT AGCACCCAGGCATACTTGAAT	Kavar et al., (2008)

b) Extração de RNA total de raízes e nódulos

O tecido vegetal congelado foi macerado em nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo até a obtenção de um extrato bem fino. Em seguida, aproximadamente 250 mg desse extrato foi transferido para microtubos de 2,0 mL e ressuspensão em 0,75 mL de tampão de extração (200 mM de Tris, pH 7, 200 mM EDTA e 1% p/v de SDS) (Simões-Araújo et al., 2003). Após homogeneização, o extrato foi submetido a extrações sequenciais em fenol/clorofórmio. Para tal, foi adicionado 0,75 mL de uma mistura contendo fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1, v/v/v), a mistura foi homogeneizada vigorosamente (30 segundos) e em seguida centrifugada (14000 rpm, 10 minutos). A fase aquosa foi coletada e re-extraída com 0,75 mL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1, v/v/v). Após centrifugação (14000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante foi submetido a uma extração com fenol e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e 0,75 mL de LiCl (4 M) foi adicionado a fase aquosa. A mistura foi incubada a 4 °C por 16 horas. O RNA foi precipitado por centrifugação (14000 rpm, 20 minutos) sendo lavado três vezes com etanol (75%), seco a temperatura ambiente e ressuspensão em água estéril (50 µL) e a qualidade foi avaliada em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. Toda manipulação das amostras para extração, quantificação e análise de qualidade do RNA extraído foi realizada a 4 °C, as soluções foram previamente tratadas com DEPC e esterilizadas. As amostras foram armazenadas em freezer a -70 °C até a sua utilização para a síntese de cDNA e amplificação por PCR ou PCR em tempo real.

c) Síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar)

O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa “SuperScript III” (Invitrogen Cat. No. 18080-093) a partir do RNA total extraído de raízes e nódulos. O RNA foi tratado com DNase I RNase Free (Epicentre® Cat. No. D9902K) mantido a 37 °C por 15 minutos seguida da inativação da enzima por 10 minutos a 65 °C. Após a incubação (10 minutos a 65 °C) de 3 µg de RNA, 1 µl de primer oligo (dT) (0,5 µg/ µl), 1 µl de dNTP (10 mM) foram adicionados 4 µl de tampão de reação (5x), µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl da transcriptase reversa RT (200 u/ µl), completando a reação para 20 µl. A síntese do cDNA foi realizada a 60 °C durante 1 hora, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos.

d) Análise da expressão por PCR

As reações de PCR, para a análise de expressão por RT-PCR, foram realizadas em um equipamento Mastercycle 22331 (Hamburg Eppendorf AG). Foram utilizados 10 µL de cDNA diluído (1:50), 0,05 µL de cada iniciador (10 pmol µL⁻¹) para cada gene estudado (Tabela 3 e 4), 5,3 µL de H₂O livre de nuclease, 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µL de tampão de PCR (10X) e 0,05 µL de Platinum Taq DNA polimerase (5 u/µl) (Invitrogen - Molecular Probes, Cat. No. S7563). A reação foi incubada por 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 60 °C por 10 segundos, 72 °C por 15 segundos.

e) Eletroforese em gel de agarose

Após a reação de amplificação, 2 µL de tampão da amostra foi adicionado a 10 µL de cada amostra, sendo submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak).

3.3. Avaliação da Expressão dos Genes ENOD40 e Leghemoglobina em Feijoeiro

3.3.1. Condições experimentais

O experimento foi conduzido de agosto a setembro de 2010. As condições foram as mesmas descritas no item 3.1.1, sendo utilizadas sementes da cultivar Manteigão, que apresenta grão bege e hábito de crescimento indeterminado ereto (Tipo II).

Foi adotado um delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2x2x6 com 6 repetições, entre dois teores de P na semente (baixo e alto teor de P), dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (125 e 500 µM de P) e sete épocas de coleta (2, 4, 6, 8, 10, 25, 35 dias após a inoculação - DAI).

Foram semeadas seis sementes por vaso. O desbaste foi realizado 5 dias após emergência, permanecendo 4 plantas nos vasos destinados às 1^a, 2^a e 3^a coletas; 3 plantas nos vasos destinados às 4^a e 5^a coletas e 2 plantas nos vasos destinados às 6^a e 7^a coletas. Em cada coleta, as plantas foram separadas em parte aérea, raiz e nódulos. Na 1, 2, 3, 4 e 5^a coleta foi realizada avaliação da expressão gênica. Na 3^a, 5^a, 6^a e 7^a coleta, respectivamente aos 6, 10, 25 e 35 dias após a inoculação (DAI), foi realizada avaliação de biomassa. De modo a reduzir o efeito da variabilidade biológica e obter material suficiente para extração de RNA, cada tratamento foi composto de 6 repetições, sendo este grupo subdividido em grupos de 3 repetições, consistindo em 8 plantas por repetição nas três primeiras coletas (2, 4 e 6 DAI), 6 plantas na 4 e 5^a coleta (8 e 10 DAI). Após a queda dos cotilédones, os vasos destinados a 5^a, 6^a e 7^a coleta (10, 25 e 35 DAI), foram mantidas com a solução nutritiva aplicada ao substrato. A inoculação foi realizada após a germinação das plantas, nas mesmas condições descritas no Experimento I.

Os nódulos foram separados das raízes e armazenados como citado no experimento I. Os nódulos e as raízes foram utilizados para extração do RNA, para avaliação da expressão dos genes de referência (controle) por experimentos de PCR e dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* por PCR em tempo real.

Foi realizada análise de variância para os dados de cada coleta isoladamente, avaliando os efeitos do teor de P na semente, do nível de P no substrato e de suas interações.

3.3.2. Análise da expressão gênica por PCR e PCR em tempo real

A extração de RNA das raízes e nódulos, a síntese de primeira fita de cDNA, PCR e a eletroforese em gel de agarose, foram realizadas conforme descrito no Experimento II.

a) Reação de PCR em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram feitas utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA). Foram utilizados 10 µL de cDNA diluído (1:50), 0,05 µL de cada iniciador (10 pmol/µl) (Tabela 5), 2,0 µL SYBR Green 1x SYBR® (Invitrogen, Cat. No. 10966-030), 4,3 µL de H₂O livre de nuclease, 1,2 µL de MgCl₂ (50mM), 2,0 µL de tampão de PCR (10X) e 0,05 µL de Platinum Taq DNA polimerase Platinum (5 u/µl) (Invitrogen - Molecular Probes, Cat. No. S7563). A reação foi incubada por 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 60 °C por 10 segundos, 72 °C por 15 segundos. Cada reação foi realizada em triplicadas para cada par de iniciador. Os dados brutos da fluorescência obtidos das replicadas biológicas para cada tratamento foram usados para avaliar a eficiência dos iniciadores utilizando o programa *on-line* Real-time PCR *Miner* (Zhao & Russel, 2005). Estes valores de Ct (ciclo de quantificação) gerados pelo *Miner* foram utilizados no programa *qBase*, versão 1.3.5 (Hellemans et al., 2007).

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primer) utilizados no experimento III nas reações de PCR e PCR em tempo real para avaliação da estabilidade de genes referência (controle) e expressão dos genes *Enod40* e leghemoglobina em nódulos de feijão cultivar Manteigão.

	Iniciadores	
	Forward/Reverse	Referência
<i>Pv</i> GAPDH2	TCACGCCATCACAGCTACTC CCAGTGCTGCTGGGAATAAT	Este trabalho
<i>Pv</i> ACT2	AGTTCAGCCGTTGAGAAGAG ATGGATGGCTGGAACAGAAC	Este trabalho
<i>Pv</i> EF1a	AGGCTGATTGTGCTGTCCTT ACACCAAGGGTGAAAGCAAG	Este trabalho
<i>Pv</i> LegA	GAGGCTCTGGTGAACAGCTC TGAGCCGTGAGCTTAGGATT	Este trabalho
<i>Pv</i> LegB	TCACTGAGAAGCAAGAGGCT GCTGCTGCCAATTCATCGTA	Cárdenas et al., 2006
ENOD40A	CCTCTTTCGACAGTTTGCTTG GAGTCCATTGCCTTTTTGTGA	Cárdenas et al., 2006

b) Análise dos genes referência selecionados

A estabilidade de expressão foi determinada pelo programa *GeNorm* v3.5 (Vandesompele et al., 2002) e *NormFinder* (Endersen et al., 2004). O *geNorm* determina o gene constitutivo mais estável de um conjunto de gene testados e calcula o valor de estabilidade (*M*) de expressão de cada gene. Genes com menor valor *M* têm sua expressão mais estável. O *NormFinder* calcula variação intra-grupo e inter-grupo, onde os grupos são definidos como as diferentes condições experimentais. Os valores de *C_q* (ciclo de quantificação) dos genes referência foram transformados em quantidades relativas não normalizadas pelo programa *qBase* v1.3.5 (Hellemans et al., 2007), utilizando a fórmula $Q = E^{-\Delta C_q}$ (*Q*= quantificação relativa; *E*= eficiência da amplificação, ΔC_q = amostra com menor expressão – *C_q* da amostra), estas quantidades são exportadas para o *Genorm* e *NormFinder*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Nodulação do Feijoeiro Afetado pelo Teor de Fósforo na Semente sob Diferentes Níveis de Fósforo no Substrato - Experimento I

Os níveis de P no substrato influenciaram a produção de matéria seca da parte aérea (Figura 1). As plantas crescidas no maior nível de P (1000 μM) apresentaram maior produção de massa seca aos 30 e 40 dias após emergência (DAE), quando comparadas às plantas crescidas nas demais doses, o que demonstra a importância do suprimento adequado de P no crescimento vegetativo do feijoeiro. O alto teor de P na semente estimulou a produção de massa seca da parte aérea, quando comparado às plantas provenientes de sementes com baixo teor de P, nas duas épocas de coleta, porém este aumento só foi significativo nos menores níveis de P (0, 125 e 500 μM) (Figura 1). Teixeira et al. (1999) verificaram que os efeitos do maior teor de P na semente no estímulo do crescimento da parte aérea diminuíram com o aumento da disponibilidade de P no solo. Araújo et al. (2002) também observaram que plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de P se tornavam menos dependentes do P do solo do que plantas originadas de sementes com baixo teor de P.

Plantas oriundas de sementes com alto teor de P apresentaram maior massa de nódulos nos níveis de 0, 125 e 250 μM de P, aos 30 DAE (Figura 1). À medida que o nível de P na solução nutritiva aplicada aumentou, houve uma redução do efeito do P da semente no incremento da massa de nódulos (Figura 1), o que indica que o efeito adicional do P da semente na nodulação é muito dependente da disponibilidade do P no substrato. Aos 30 DAE, a maior produção de massa seca de nódulos foi registrada em 500 e 1000 μM , entretanto é possível observar uma tendência no decréscimo da massa do nódulo na dose de 1000 μM , particularmente aos 43 DAE, em sementes com alto teor de P. Esta redução da nodulação resultante do alto nível de P na semente e maior dose de P aplicada pode ser explicada pelo aumento da disponibilidade deste nutriente à planta, causando uma possível toxidez. A relação raiz:parte aérea foi menor em plantas provenientes do alto P na semente, no nível de 0 μM , e na média dos diferentes níveis de P no substrato aos 30 e 43 DAE.

Sob deficiência de P, a inibição do crescimento radicular é menos intensa do que a redução no crescimento da parte aérea, aumentando a relação raiz:parte aérea, o que está relacionado com a partição de carboidratos alocados para as raízes, permitindo manter o crescimento radicular de modo a extrair P do solo (Araújo et al., 1998).

Aos 30 DAE, a produção de matéria seca de nódulos aumentou 4,0 e 2,8 vezes entre a maior (1000 μM) e a menor dose na solução nutritiva aplicada ao substrato (0 μM), respectivamente para plantas originadas de sementes com baixo teor de P (Figura 1), enquanto este aumento na parte aérea foi de 1,8 e 1,6 vezes, confirmando a resposta mais intensa ao suprimento de P dos caracteres associados à FBN (Araújo et al., 1998). Aos 43 DAE a massa seca de nódulos aumentou 3,6 e 1,3 vezes entre os níveis de 0 e 1000 μM , enquanto para a massa da parte aérea o aumento foi de apenas 4,2 e 1,8, respectivamente. Isto demonstra que plantas originadas de sementes com alto teor de P são menos dependentes do suprimento externo de P, com menores respostas ao aumento do nível de P no substrato (Teixeira et al., 1999).

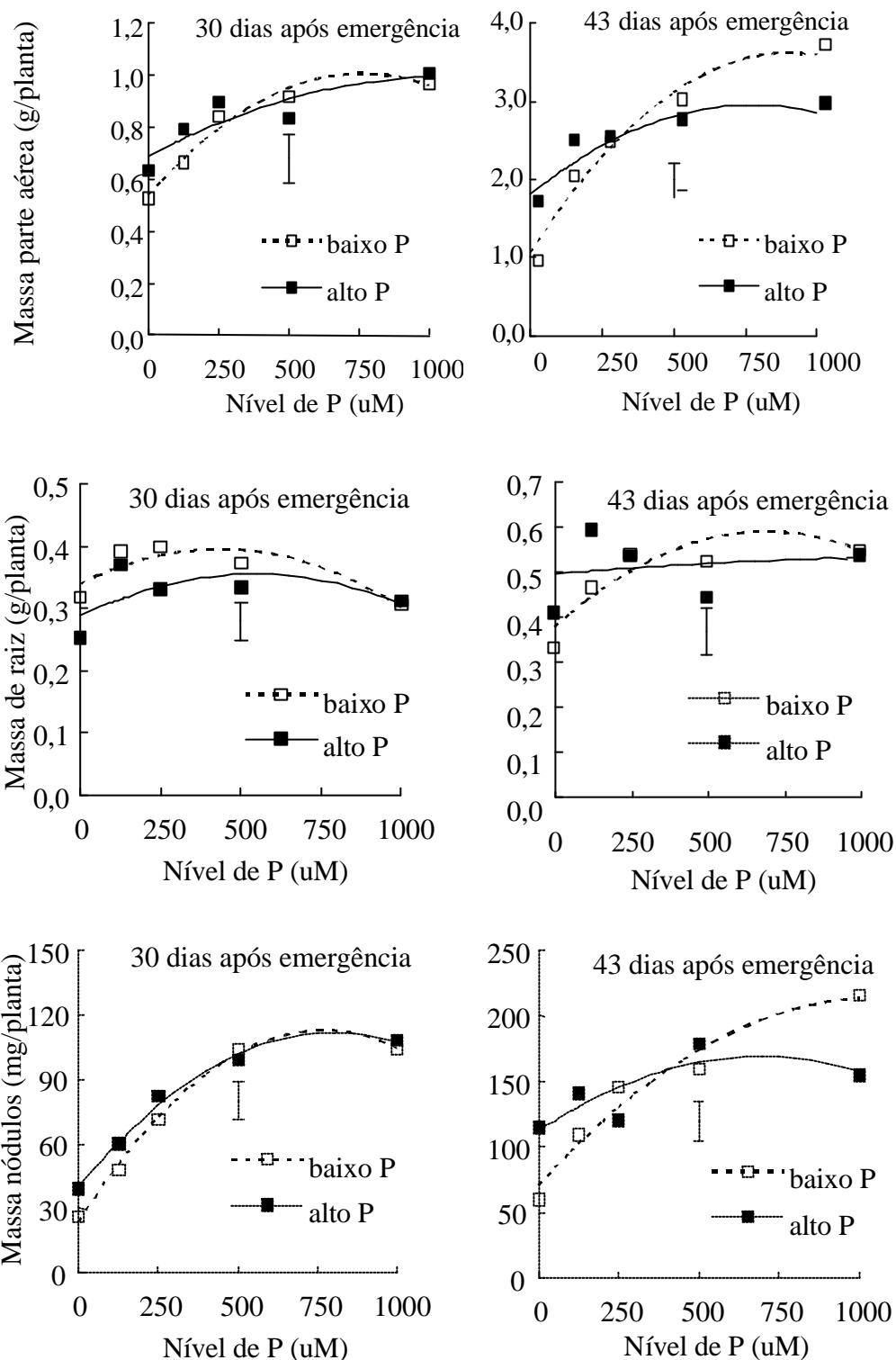


Figura 1. Massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca de nódulos de plantas de feijoeiro cv carioca, provenientes de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P no substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência); quadrados representam as médias experimentais, as linhas o modelo polinomial de 2º grau ajustados aos dados, e as barras verticais a diferença mínima significativa pelo teste de Duncan a 5% que comparam teor de P na semente dentro de cada nível de P no substrato.

Tabela 4. Razão raiz:parte aérea e massa unitária de nódulos, de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência).

Nível de P na solução (μM)	30 dias após a emergência			43 dias após a emergência		
	Baixo P	Alto P	Média	Baixo P	Alto P	Média
Razão raiz:parte aérea (mg g^{-1})						
0	670	463*	567 a	468	331*	400 a
125	715	544	630 a	307	307	307 b
250	558	461	510 ab	291	270	281 b
500	520	519	520 ab	237	236	237 c
1000	425	418	422 b	213	243	228 c
Média	578	481*		303	277*	
Massa unitária de nódulo (μg)						
0	380	308	344	540	635	588
125	357	419	388	484	665	575
250	461	392	427	646	771	709
500	395	440	418	535	643	589
1000	326	354	340	560	713	637
Média	384	383		553	686*	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5%. * Diferença significativa entre teor de P na semente pelo teste Duncan a 5%.

Não houve efeitos do teor de P na semente na massa seca da raiz aos 30 DAE (Figura 1). Aos 43 DAE, o maior teor de P na semente aumentou a massa seca da raiz em 125 μM de P, embora não tenha provocado efeitos significativos na razão raiz: parte aérea. Não foram verificadas diferenças significativas aos 30 DAE na massa unitária de nódulo nos diferentes tratamentos (Tabela 6). Aos 43 DAE o maior teor de P na semente causou um aumento na massa unitária de nódulo na média dos diferentes níveis de P no substrato.

O acúmulo de N na parte aérea foi afetado pelas doses de P aplicadas com a solução nutritiva (Figura 2). O menor acúmulo de N foi observado na ausência de P na solução nutritiva e o maior acúmulo no nível de 1000 μM de P, tanto aos 30 quanto aos 43 DAE. Plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de P apresentaram maior acumulação de N na parte aérea, quando comparado com o baixo P na semente, nos três menores níveis de P (0, 125, 250 μM de P) aos 30 DAE. Nos maiores níveis de P (500 e 1000 μM de P), não houve diferença significativa entre os teores de P na semente. Aos 43 DAE, o alto P na semente aumentou o acúmulo de N nas menores doses de P (0, 125 μM de P) em comparação com o baixo P na semente, entretanto nas maiores doses de P (500 e 1000 μM de P), responderam de forma similar aos teores de P na semente. Estes resultados confirmam as observações de Araújo et al. (2002), demonstrando que sementes com alto teor de P podem aumentar o acúmulo de N em plantas de feijoeiro, particularmente sob baixas doses de P aplicado ao solo.

Os resultados deste experimento mostraram que o nível de 125 μM de P na solução nutritiva aplicada ao substrato permitiram a observação do efeito do P da semente, já o nível de 500 μM de P não permitiu observar o efeito do P na semente. Com base nestes resultados, estes níveis de 125 e 500 μM de P foram utilizados nos dois experimentos posteriores, com o

objetivo de avaliar a expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina*, através da PCR em tempo real.

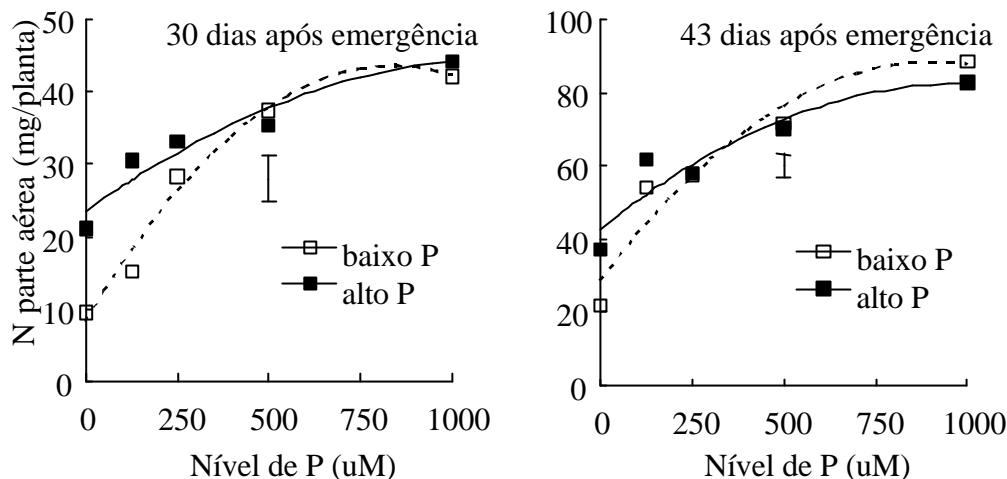


Figura 2. Acúmulo de N na parte aérea de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, proveniente de sementes com baixo e alto teor de P, sob cinco níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (30 e 45 dias após emergência); quadrados representam as médias experimentais, as linhas o modelo polinomial de 2º grau ajustados aos dados, e as barras verticais a diferença mínima significativa pelo teste de Duncan a 5% que comparam teor de P na semente dentro de cada nível de P no substrato.

4.2. Validação dos Genes Normalizadores Através da RT-PCR em Nódulos de Feijão - Experimento II

4.2.1. Produção de biomassa

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do P na semente e na solução nutritiva sobre os parâmetros relacionados à fixação biológica de N_2 (FBN). Entretanto, devido à ausência de nódulos nas primeiras coletas, foi possível avaliar os caracteres de nodulação apenas a partir da 3ª coleta aos 6 dias após a emergência (DAE).

Não houve diferença significativa do teor de P na semente na massa seca da parte aérea e raiz aos 3 DAE (Tabela 7). As plantas provenientes de sementes com baixo teor de P apresentaram maior produção de massa seca de parte aérea e raiz aos 5 DAE, quando comparada às plantas oriundas de sementes com alto teor de P (Tabela 7).

Foram observadas temperaturas elevadas no início do período de condução do experimento, em outubro de 2009, o que causou estresse térmico, provocando a estiolação e queima nas folhas primárias. Foi observado visualmente que as plantas originadas de sementes com alto teor de P apresentaram crescimento inicial mais vigoroso, com emissão de folhas primárias e primeiro trifólios mais desenvolvidos, mas, por conseguinte sofreram mais intensamente o estresse hídrico, com intensa senescência das folhas primárias. Isto pode explicar a menor biomassa de parte aérea das plantas oriundas de sementes com alto teor de P (Tabela 7).

Tabela 5. Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (125 e 500 μM), aos 3 e 5 dias após emergência (DAE).

P da semente	Massa de parte aérea (g planta^{-1})	Massa de raiz (g planta^{-1})
--------------	---	--

Letras comparam níveis de P nas colunas pelo teste Duncan a 5%.

* Diferença significativa entre teor de P na semente pelo teste Duncan a 5%.

Não houve diferença significativa na massa de nódulos entre os teores de P da semente aos 10 e 15 DAE (Tabela 8). O alto nível de P na semente aumentou o número de nódulos na média dos diferentes níveis de P na solução nutritiva aos 10 e 15 DAE. Este resultado demonstra que o suprimento adicional de P na semente contribui para a formação e desenvolvimento dos nódulos. O alto P na semente aumentou a razão raiz:parte aérea apenas aos 15 DAE na média dos diferentes tratamentos de P aplicados na solução nutritiva. O maior nível de P aplicado na solução nutritiva (500 μM) aumentou a massa unitária nódulo no baixo P na semente aos 15 DAE (Tabela 8). Plantas oriundas de semente com baixo P apresentaram maior massa unitária de nódulo, no maior nível de P em solução nutritiva, já no alto P na semente não houve diferenças significativas entre os níveis de P na solução.

Tabela 6. Massa seca de nódulo, número de nódulo, razão raiz:parte aérea e massa unitária de nódulos, de plantas de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, em duas épocas de coleta (10 e 15 dias após emergência).

Níveis de P no substrato (μM)	10 dias após a emergência			15 dias após a emergência		
	Baixo P	Alto P	Média	Baixo P	Alto P	Média
	Massa de nódulos (g planta^{-1})					
125	14	21	18	22	30	26b
500	17	19	18	35	32	33a
Média	15	20*		29	31	
	Número de nódulos (planta^{-1})					
125	56	89	72a	70	86	78a
500	61	80	71a	74	101	88a
Média	59	85		72	94*	
	Razão raiz:parte aérea (mg g^{-1})					
125	341	381	361a	285	323	304a
500	284	339	311a	274	343	309a
Média	313	360		280	333*	
	Massa de 1 nódulo (μg)					
125	238	235	237a	316b	351a	334a
500	274	241	258a	465a	318a*	392a
Média	256	238		391	335	

* Diferença significativa entre teor de P na semente pelo teste Duncan a 5%.

Letras comparam níveis de P nas colunas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 7. Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Carioca, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (125 e 500 μM), em duas épocas de coleta (10 e 15 dias após emergência).

Nível de P no substrato (μM)	10 dias após emergência			15 dias após emergência		
	BP	AP	Média	BP	AP	Média
Massa de parte aérea (g planta^{-1})						
125	2,16	1,99	2,08a	3,67	3,00	3,34a
500	2,60	2,03	2,31a	3,64	2,75	3,19a
Média	2,38	2,01*		3,66	2,88*	
Massa de raiz (g planta^{-1})						
125	0,59	0,54	0,56a	0,83	0,67	0,75a
500	0,58	0,50	0,54a	0,66	0,63	0,65b
Média	0,58	0,52		0,74	0,65	

* Diferença significativa entre teor de P na semente pelo teste Duncan a 5%.

Letras comparam níveis de P nas colunas pelo teste Duncan a 5%.

Não foi verificada a influência dos níveis de P aplicados na solução nutritiva na massa seca de parte aérea nas diferentes épocas de amostragem (Tabela 9). Na média dos diferentes teores de P na semente, a menor dose de P na solução aumentou a massa de raiz (Tabela 9).

Desta forma, apesar dos efeitos negativos do alto P da semente sobre a massa de parte aérea em virtude do estresse ambiental ocorrido no experimento, o alto teor de P da semente estimulou a nodulação do feijoeiro (Tabela 8), e estas plantas foram utilizadas para a escolha dos genes de referência para análise de PCR em tempo real.

4.2.2. Seleção de genes referência para análise de PCR em tempo real

Inicialmente foram utilizados para análise deste trabalho, iniciadores selecionados baseados em diversos trabalhos da literatura (Tabelas 3 e 4). As análises por RT-PCR mostraram que em todas as épocas de amostragem (aos 3, 5, 10 e 15 DAE), houve variação no padrão de expressão dos genes *PvUbiquitin*, *EF1AlphaA*, *PvActin* e *PvTubulin* nos diferentes tratamentos, com o nível de intensidade das bandas no alto P na semente superior ao baixo P na semente em todas as épocas (Figuras 3, 4 e 5). A maioria dos genes normalizadores selecionados para as reações de PCR em tempo real se baseia no papel desses genes nos processos básicos da manutenção da estrutura celular ou metabolismo basal. Entretanto, o P é fortemente ligado aos processos metabólicos, como estabilidade e síntese da membrana plasmática, transferência de energia, síntese de ácido nucléico, glicólise, ativação e desativação de enzima e respiração (Vance et al., 2003), o que pode ter colaborado para influenciar o perfil de expressão desses genes.

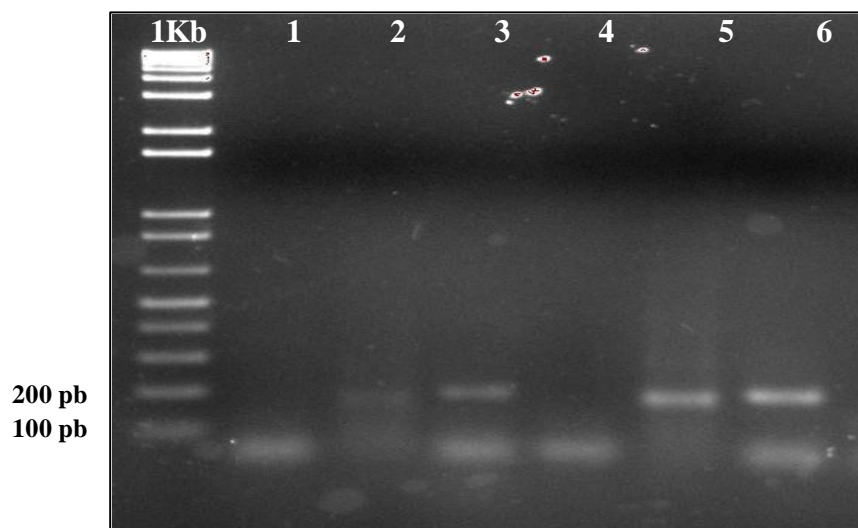


Figura 3. Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência, através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijão cultivar Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P em dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μ M de P) aos 3 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular 1: EF1-AlphaA alto P na semente; 2: PvActin alto P na semente; 3: PvTubulin alto P na semente; 4: PvEF1a baixo P na semente; 5: PvActin baixo P na semente; 6: PvTubulin baixo P na semente.

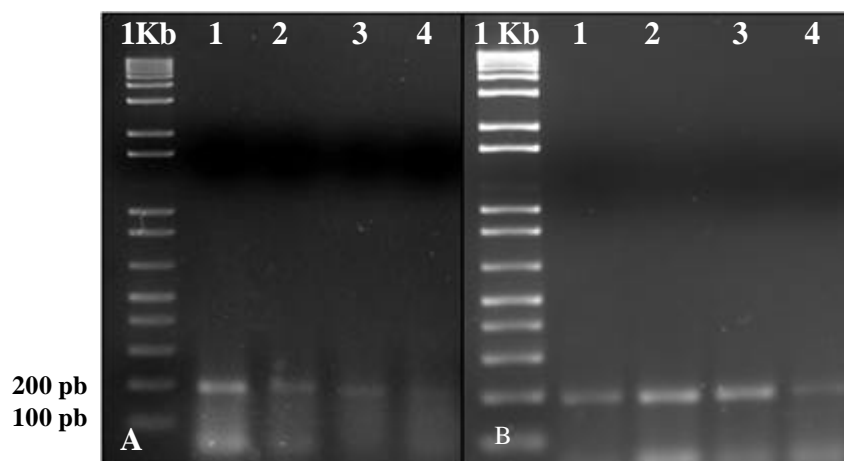


Figura 4 Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência, através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μ M de P) aos (A) 5 dias após emergência, (B) aos 15 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular; 1: PvTubulin alto P na semente; 2: PvTubulin baixo P na semente; 3: PvActin alto P na semente; 4: PvActin Baixo P na semente.

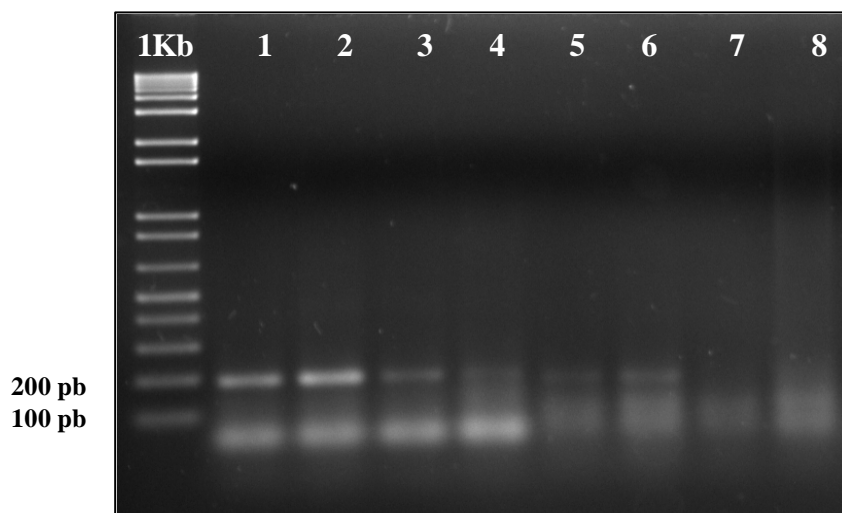


Figura 5. Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μ M de P) aos 10 dias após emergência. M: Marcador de peso molecular; 1: PvTubulin alto P na semente, alto P no substrato; 2: PvTubulin alto P na semente, baixo P no substrato; 3: PvTubulin baixo P na semente, alto P no substrato; 4: PvTubulin baixo P na semente, baixo P no substrato; 5: PvActin alto P na semente, alto P no substrato. 6: PvActin alto P na semente, baixo P no substrato; 7: PvActin baixo P na semente, alto P no substrato. 8: PvActin baixo P na semente, baixo P no substrato.

Para ser utilizado como referência, o gene deve apresentar um nível constante de expressão nos diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento, além de não ser afetado pelas condições experimentais (Iskandar et al., 2004). Pelo fato dos genes testados apresentarem limitações para o uso como referência, novos genes foram selecionados. Para tanto, os genes previamente identificados como referência em *Arabidopsis* foram utilizados para uma busca no banco de EST de feijão. Essa análise permitiu selecionar novos genes constitutivos descritos para *Arabidopsis* e novos iniciadores foram desenhados para esses genes.

A Figura 6 mostra a amplificação utilizando os iniciadores para os genes *PvGAPDH1*, *PvGAPDH2*, *PvACT2*, *EF-1Alpha*, *PvTracBP*, *PvYLS8*, *PvPolyp*, *PvSAND* e *PvUBQ9*. Exceto para os iniciadores desenhados para o gene *PvUBQ10*, que apresentou dois fragmentos amplificados, para os demais foi observada apenas uma banda correspondente ao tamanho esperado para cada par de iniciador (aproximadamente 150 pares de base). Além disso, foi observado um nível de expressão bastante similar entre os diferentes tratamentos. O iniciador para o genes *PvSAND* não amplificou para o tratamento com o baixo P na semente. Segundo Vandesompele et al. (2002), o uso de pelo menos dois ou três genes de referência como controles internos se faz necessário, para evitar erros que possam surgir a partir da expressão instável de um único gene de referência. Desse modo, foram selecionados os genes *PvGAPDH2*, *PvACT2* e *PvEF-1Alpha*, para as análises subsequentes.

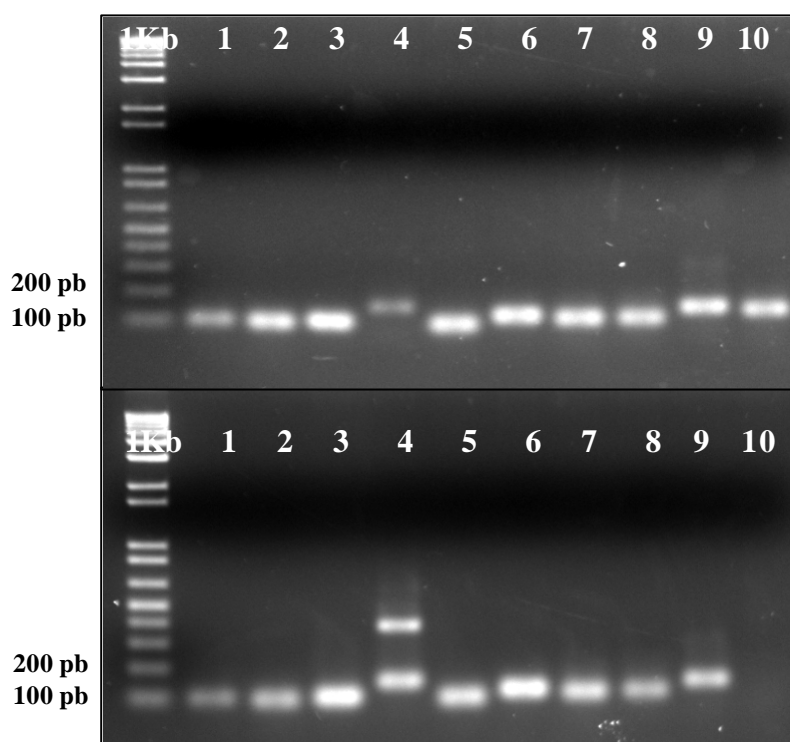


Figura 6. Confirmação dos amplificons dos iniciadores para os genes referência. Confirmação de produto único de amplificação para cada um dos genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação dos tamanhos esperados para os amplificons em nódulos de feijoeiro cv. Carioca, originados de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μ M de P) aos 3 dias após emergência. (A) Alto P na semente. 1: PvGAPDH1; 2: PvGAPDH2; 3: PvUBQ9; 4: PvUBQ10; 5: PvACT2; 6: PvYLS8; 7: PvPolyp; 8: PvEF-1Alpha; 9: PvTracBP; 10: PvSAND. (B) Baixo P na semente. 1: PvGAPDH1; 2: PvGAPDH2; 3: PvUBQ9; 4: PvUBQ10; 5: PvACT2; 6: PvYLS8; 7: PvPolyp; 8: PvEF-1Alpha; 9: PvTracBP; 10: PvSAND.

4.3. Avaliação da Expressão dos Genes ENOD40 e Leghemoglobina em Feijoeiro

4.3.1. Avaliação por PCR em tempo real dos genes referência

A identificação e validação da estabilidade da expressão do gene referência é essencial para adequada utilização da PCR em tempo real, para quantificação da expressão gênica. A partir dos resultados obtidos no Experimento II, procederam-se os ensaios da PCR em tempo real. Foram selecionados os genes do fator de alongamento 1-alpha (*EF1-alpha*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e Actina (*ACT2*), que além de apresentarem resultados satisfatórios nos nossos experimentos, são frequentemente utilizados como gene normalizadores em experimentos de *Northern blot* e RT-PCR. Os genes utilizados como controle, em muitos casos, têm sido usados em ensaios, na suposição de que seriam expressos constitutivamente em função do seu papel no metabolismo. No entanto, nem todos os genes mostraram expressão constitutiva em todas as condições testadas, especialmente quando analisadas por PCR em tempo real (Czechowski et al., 2005). Por este motivo, Jain et al. (2006) recomendaram que os genes constitutivos devam ser validados antes de sua utilização como controle interno. Esses genes referência com expressão estável podem apresentar variação em função da fase do desenvolvimento da planta e das condições experimentais.

1,00 e 0,97 (Figura 7). Esses genes já foram testados, sendo indicados como normalizadores em batata, uva (Reid et al., 2006) e arroz (Jain et al., 2006).

A especificidade dos iniciadores selecionados foi confirmada pela presença de um único amplicon no gel de agarose e na curva de dissociação (*Miner*) (Figura 7), a presença de dois ou mais picos revela a ocorrência de produto inespecífico.

Os resultados obtidos com o GeNorm são apresentados na Figura 8. O valor M obtido para os genes *Actina* e *EF1-Alpha* foi de 0,243 e para o gene *GAPDH2* de 0,265, sendo assim, foram selecionados os genes *Actina* e *EF-1Alpha* como a melhor combinação para seleção de genes normalizadores.

Embora o valor *M* do *GAPDH* ser baixo, não foi necessário adicionar este gene como normalizador. Bastolla et al. (2007), trabalhando com folhas e xilemas de *Eucaliptus grandis*, observaram que o gene *GAPDH* apresentou uma variação considerável nas suas expressões entre os tecidos. Da mesma forma, o *GAPDH* não apresentou estabilidade em amostras de semente e pólen de plantas de *Arabidopsis* (Czechowski et al., 2005). Entretanto, na normalização da expressão gênica avaliada em sementes de *Theobroma cacao*, *GAPDH* foi um dos três mais adequados (Pinheiro, 2009).

Os genes referência não foram influenciados pelas condições experimentais (alto e baixo P na semente), apesar deste nutriente estar tão fortemente ligado aos processos metabólicos.

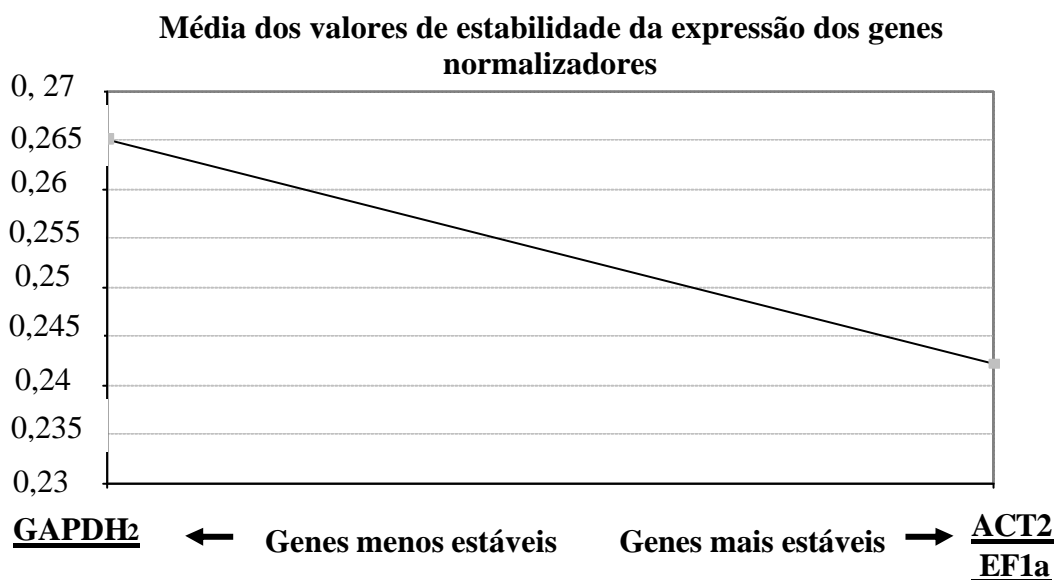


Figura 8. Classificação dos genes candidatos GAPDH, ACT2 e EF1a com base nos valores de estabilidade de expressão (M) determinada pelo programa geNORM em 24 amostras de cDNA de nódulos de feijoeiro cv. Manteigão testados em duas condições experimentais (alto P e baixo P na semente). Os genes com expressão mais constitutiva estão indicados à direita do gráfico, os que apresentam expressão menos estável, estão ao lado esquerdo.

4.3.2. Validação dos iniciadores desenhados para os genes *Enod40* e *leghemoglobina*

Foi avaliada a eficiência de amplificação e especificidade, para validar o uso dos iniciadores (Tabela 5), através da RT-PCR e da curva de dissociação (Melt curve).

Foi observada através da RT-PCR, apenas uma banda em gel de agarose 2% para os dois genes alvos (Figura 9). A especificidade dos iniciadores foi confirmada através da curva de dissociação, com a presença de um único pico no final da reação de PCR em tempo real.

Como resultado dessas análises, os iniciadores desenhados não permitiram a amplificação de quaisquer outros produtos senão os genes alvos. Entretanto, o *PvLegA* apresentou baixa eficiência de amplificação, 0.79 sob as condições testadas. Novos experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando um novo iniciador (*PvLegB*). Este iniciador não apresentou resultados satisfatórios, demonstrando uma baixa eficiência (0.77) em relação ao iniciador utilizado no ensaio anterior. Desta forma o iniciador *PvLegA* foi novamente utilizado nos experimentos subseqüentes.

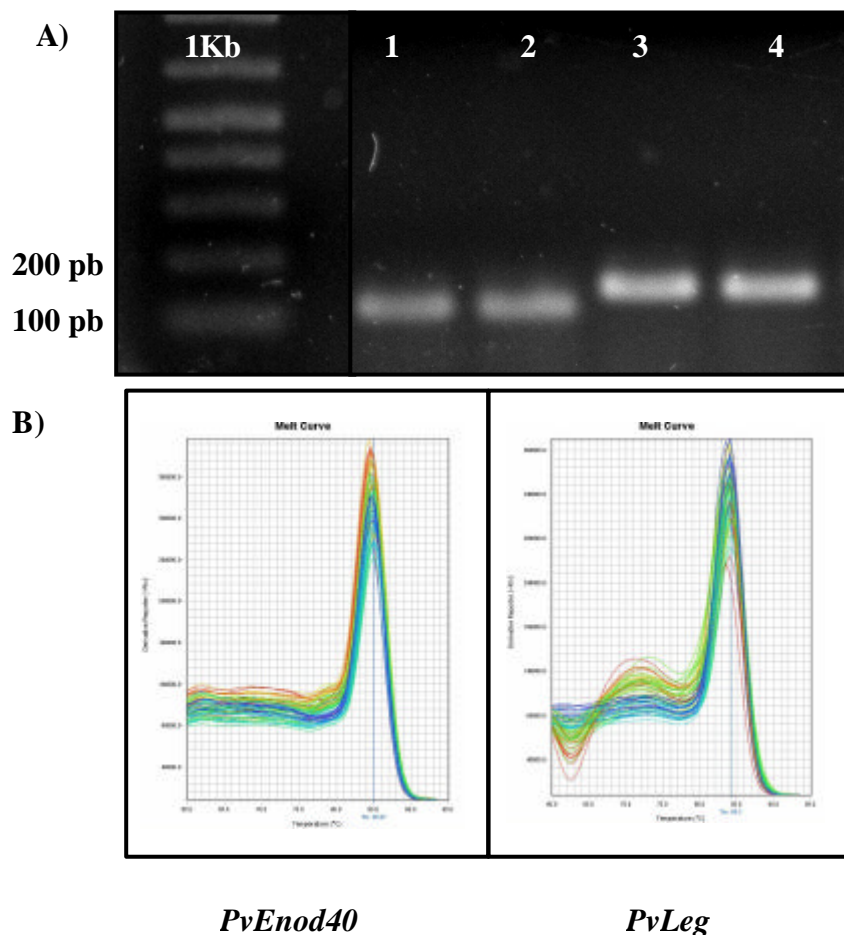


Figura 9. Confirmação dos amplicons e especificidade dos iniciadores para os genes Alvos. (A) Confirmação de produto único de amplificação para cada um dos genes referência através da PCR e eletroforese em gel de agarose 2% (1) Alto P *PvEnod40*; (2) Baixo P *PvEnod40*; (3) Alto P *PvLeg* (4) Baixo P, *PvLeg*. (B) Confirmação da especificidade das reações de PCR em tempo real através da curva de dissociação para os genes normalizadores *PvEnod40* e *PvLeg* em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão originadas de sementes com alto e baixo teor de P e dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μM de P) aos 2 dias após inoculação.

4.3.3. Expressão dos genes *Enod 40* e *leghemoglobina* por PCR em tempo real

Para avaliar a expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina*, as plantas de feijoeiro (cv. Manteigão) foram inoculadas com *Rhizobium tropici* após a germinação. Foram analisadas as respostas destes genes aos teores de P na semente (alto e baixo P) e aos níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (250 e 500 μM de P) em cinco épocas de coleta (aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação – DAI).

Para *Enod40*, aos 2 DAI não foi observada diferenças nos níveis de expressão entre os diferentes teores de P na semente (Figura 10), não havendo efeito do P na antecipação do processo de nodulação. Asad et al. (1994), trabalhando com a expressão do gene *MsENOD40* em alfafa, demonstraram que a indução ocorre 1 DAI no periciclo antes da divisão das células corticais, entretanto Corich et al. (1998) verificaram que raízes não inoculadas apresentaram baixos níveis de transcritos de *SrENOD40*. Quando houve a inoculação com *Sinorhizobium rostrata*, os níveis de transcrição começaram a aumentar 4 e 8 horas após a inoculação (Corich et al., 1998). Takeda et al. (2005) também verificaram que induções significativas foram observadas 6 e 12 horas após aplicação do fator Nod purificado. Além disso, a primeira coleta foi realizada aos 2 DAI, neste período este gene pode esta sendo fortemente expresso no periciclo e na divisão das células corticais. Sendo assim, o período escolhido para esta coleta pode ter sido tardio.

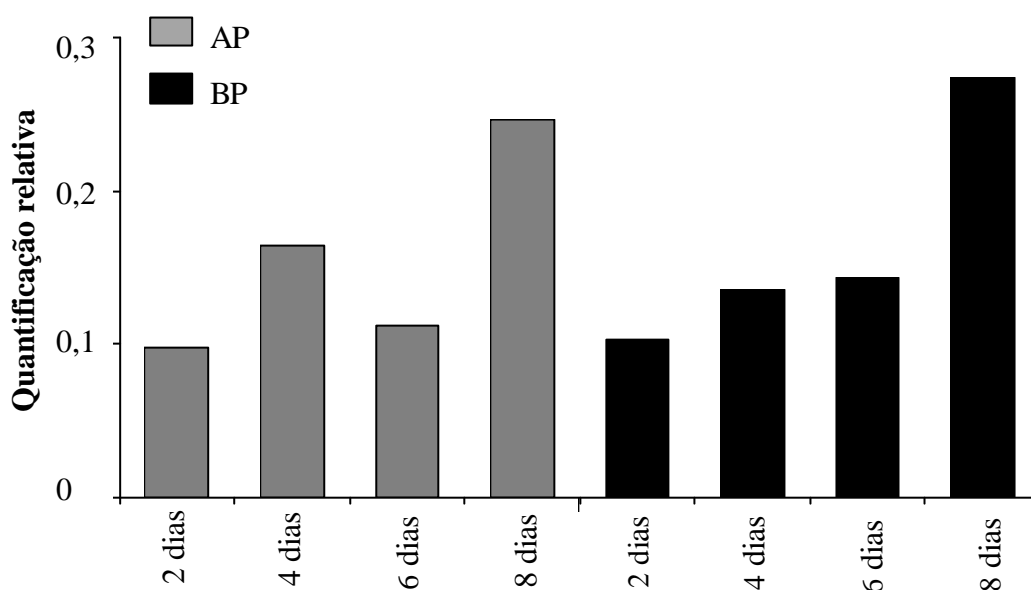


Figura 10. Expressão relativa do gene *Enod40* em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, em 4 épocas de coleta (2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação). Os genes referência *GAPDH1* e *Act2* foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P.

O padrão de expressão do *Enod40* se manteve semelhante aos 4, 6 e 8 DAI entre os diferentes tratamentos (Figura 10). Corich et al. (1998), verificando a expressão de *SrEnod40* durante a nodulação através da RT-PCR, constataram que a atividade de divisão nas células corticais parou aos 8 DAI. No final do crescimento celular, os transcritos do *SrENOD40* desapareceram do tecido central, mais ainda estavam presentes em células parenquimáticas ao redor dos feixes vasculares, e aos 20 DAI a expressão em volta do feixe vascular também desapareceu (Corich et al., 1998). Entretanto, na 5ª coleta (aos 10 DAI), houve um aumento significativo nos níveis de expressão em função da aplicação do P em solução nutritiva (Figura 11). O tratamento com alto P na semente combinado com baixo P em solução nutritiva (125 μ M) apresentou um aumento significativo no nível de expressão do gene *Enod40* quando comparado ao baixo P na semente, e à medida que o nível de P na solução nutritiva aumentou, ocorreu um incremento no nível de expressão do *Enod40* (Figura 11).

O resultado sugere que a combinação do alto teor de P na semente com o nível de P aplicado na solução nutritiva poderia aumentar a transcrição do gene *Enod40*, principalmente em solos com baixa disponibilidade de P. Porém não existe na literatura, dados comparativos sobre a influência do P na semente e na solução nutritiva sobre a expressão do gene *Enod40*.

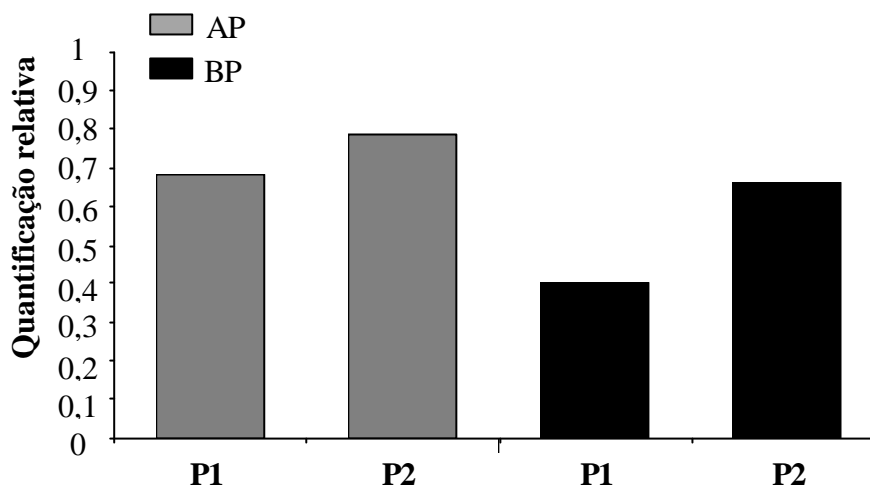


Figura 11. Expressão relativa do gene *Enod40* em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato (P1 e P2, respectivamente 125 µM e 500 µM de P) aos 10 dias após a inoculação. Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P.

A expressão do gene *Enod40* é induzida no periciclo antes da divisão das células do córtex que originam o primórdio nodular (Yang et al., 1993). Sendo assim, o alto P na semente poderia provocar um aumento na expressão desse gene e conseqüentemente alterações no processo de organogênese, favorecendo o desenvolvimento e estabelecimento do nódulo bacteriano, principalmente em solos com baixa disponibilidade de P.

A *leghemoglobina* é uma nodulina expressa especificamente no início do processo de fixação de N₂, podendo ser usada como indicador do início da FBN. Embora a *leghemoglobina* seja detectada no início da FBN, Heidstra et al. (1997) observaram que a expressão da leghemoglobina foi detectada 1h após a aplicação do fator Nod e a quantidade de mRNAsLb aumentou 8h após a adição do fator Nod. Segundo estes autores, a leghemoglobina é induzida em estágio inicial da interação planta-rizóbio, e essa expressão pode estar envolvida na facilitação do fluxo de oxigênio necessário para respiração mitocondrial nos pêlos radiculares e nas células corticais. Isto sugere que a leghemoglobina seja induzida nas fases precoces da formação do nódulo e sua expressão é aumentada fortemente quando o nódulo é formado (Heidstra et al., 1997). Contudo, neste trabalho foi avaliada a expressão deste gene aos 2, 4, 6, 8 e 10 DAI.

Em análise de *Northern Blot* estudando as respostas precoces dos fatores nod, Cárdenas et al. (2006) verificaram um padrão de acumulação de mRNA para leghemoglobina aos 6 dias, com elevado nível de transcrição aos 10 DAI. Aos 10 DAI, o baixo P na semente apresentou um maior nível de expressão da *leghemoglobina* quando comparado ao alto P na semente; entretanto, quando aumenta a disponibilidade de P na solução nutritiva (500 µM) ocorre simultaneamente um aumento na expressão da *leghemoglobina* (Figura 13). O efeito

do P na semente sobre a expressão da *leghemoglobina* só ficou evidenciado após o aumento de P na solução nutritiva, sendo possível observar esta expressão, apenas no maior nível de P (500 μ M). Sendo assim, os resultados obtidos não permitem definir uma antecipação no processo de fixação de N_2 induzida pelo maior teor de P da semente.

A deficiência de P é um fator limitante para uma eficiente nodulação e fixação de N_2 (Christiansen & Graham, 2002). Uma das principais razões para sensibilidade da leguminosa à deficiência de P é o papel que esse nutriente desempenha no crescimento e na atividade do nódulo (Tang et al., 2001). Diversos autores verificaram que o P da semente influencia de forma positiva o processo de nodulação e FBN, estimulando a produção de massa seca da parte aérea, o número e a massa de nódulos e a acumulação de N (Teixeira et al., 1999; Araújo et al., 2002; Chagas et al., 2010). Entretanto, não foi possível identificar um efeito do alto teor de P da semente sobre a antecipação do processo de FBN sob as condições experimentais estudadas.

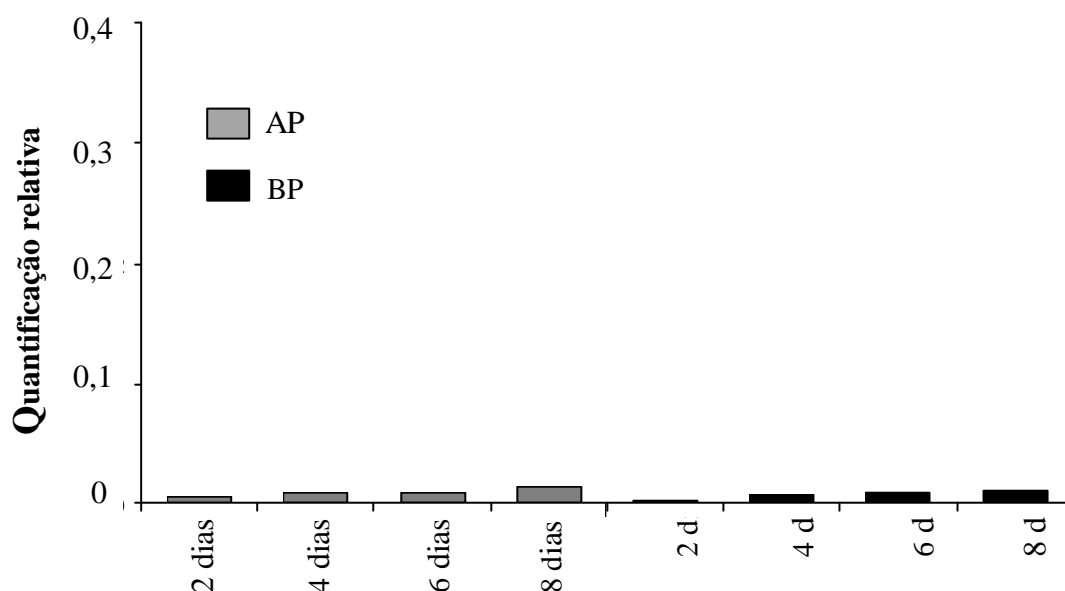


Figura 12. Expressão relativa do gene Leg em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P em 4 épocas de coleta (2, 4, 6 e 8 dias após a inoculação). Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P.

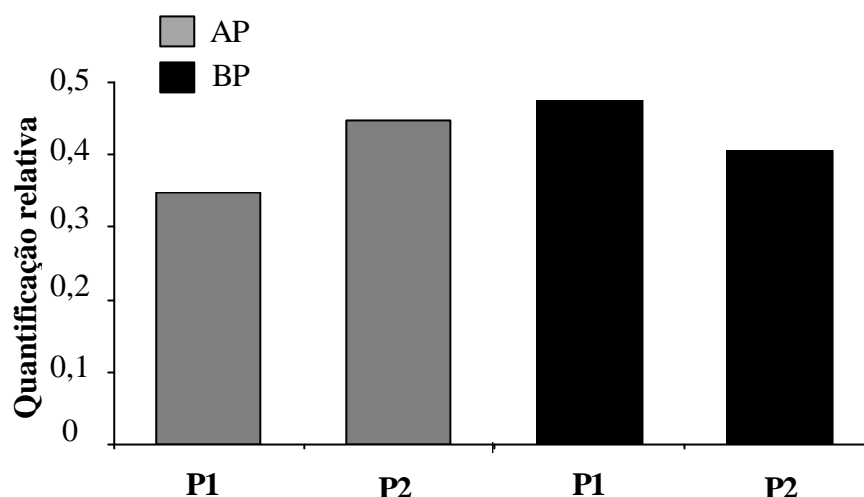


Figura 13. Expressão relativa do gene Leg em nódulos de feijoeiro cv. Manteigão, originado de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P em solução nutritiva aplicada ao substrato (P1 e P2, respectivamente 125 μM e 500 μM de P), aos 10 dias após a inoculação. Os genes referência GAPDH1 e Act2 foram utilizados para normalização. Os dados de fluorescência foram analisados pelo programa on line real time PCR Miner, para estimar os valores de Cq (ciclo de quantificação), esse valores gerados foram utilizados no programa qBase versão 1.3.5. Teores de P na semente: AP alto P; BP baixo P.

4.3.4. Produção de biomassa

Não foi verificado efeito do P na semente sobre a produção de massa de raiz e parte aérea aos 6 DAI (Tabela 10); estes resultados também foram observados na expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina* na mesma época de coleta (Figura 10 e 12). Neste período as plantas são dependentes dos nutrientes contidos nos cotilédones. A disponibilidade do nutriente na semente tem influência na formação do embrião e dos cotilédones, como consequência direta sobre o vigor e melhor desenvolvimento inicial e estabelecimento da cultura.

Tabela 8 Massa seca de parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Manteigão, provenientes de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato, aos 6 dias após inoculação.

Cultivar	Massa de parte aérea (g planta^{-1})			Massa de raiz (g planta^{-1})		
	Baixo P	Alto P	Média	Baixo P	Alto P	Média
Manteigão	1,01	1,09	1,05	0,25	0,28	0,26

Aos 35 DAE, o alto teor de P na semente aumentou a massa seca de parte aérea no nível de 500 μM de P, assim como na média dos dois níveis de P no substrato, quando comparado às plantas provenientes do baixo P na semente (Tabela 11). Estes resultados discordam daqueles observados por Teixeira et al. (1999), que verificaram uma redução no efeito do P na semente com o aumento do P no solo sobre a nodulação e crescimento. Entretanto, quando se analisa o gráfico da quantificação relativa (Figura 10), verificamos um aumento na expressão do gene *Enod40* no menor nível de P no substrato (125 μM de P) aos 10 DAI, sendo esse efeito mais intenso sob o nível de 500 μM de P. O alto teor de P da

semente aumentou a massa seca de nódulos na média dos níveis de P aplicados na solução nutritiva.

Tabela 9 Massa seca de parte aérea e raiz de plantas, nódulo e número de nódulos de plantas de feijoeiro cv. Manteigão, originadas de sementes com baixo e alto teor de P, sob dois níveis de P no substrato, aos 35 dias após inoculação.

Nível de P (μM)	Baixo P	Alto P	Média
Massa de parte aérea (g planta^{-1})			
125	1,62	1,60	1,61 b
500	1,72	2,03*	1,88 a
Média	1,67	1,81*	
Massa de raiz (g planta^{-1})			
125	0,37	0,32	0,35 a
500	0,35	0,40	0,37 a
Média	0,36	0,36	
Massa de nódulos (mg planta^{-1})			
125	115	137	126 b
500	176	188	182 a
Média	145	163*	
Número de nódulos (planta^{-1})			
125	315	289	302 b
500	366	413	390 a
Média	341	351	

* Diferença significativa entre teor de P na semente pelo teste Duncan a 5%.
Letras comparam níveis de P nas colunas pelo teste Duncan a 5%.

O maior nível de P aplicado no substrato (500 μM) aumentou a massa de parte aérea, massa de nódulos e número de nódulos na média dos diferentes teores de P na semente (Tabela 11) este resultado demonstra a importância do P sobre o processo de fixação de N_2 visto o considerável gasto energético da nitrogenase para redução do N_2 .

5. CONCLUSÕES

O estímulo do alto teor de P na semente sobre os processos associados à fixação biológica de N_2 no feijoeiro, não se deu pela antecipação dos processos de nodulação e fixação de N_2 do nódulo, mas sim pela intensificação do crescimento vegetal. Plantas de feijoeiro provenientes de sementes com altos teores de P apresentaram maior acúmulo de N e maiores massa de parte aérea, nódulos e raízes nos menores níveis de P na solução nutritiva aplicada ao substrato. O alto teor de P na semente estimulou a produção de massa seca da parte aérea e a massa de nódulos, quando comparado às plantas provenientes de sementes com baixo teor de P, porém este aumento só foi significativo nos menores níveis de P no substrato (0, 125 e 500 μ M). À medida que o nível de P no substrato aumentou, houve uma redução do efeito do P da semente, confirmando que o efeito do P da semente é muito dependente da disponibilidade do P no substrato.

Os genes *PvAct2* e *Ef-1a*, associados respectivamente à constituição estrutural do citoesqueleto e à ligação do GTP ao aminoacil-tRNA, mostraram-se adequados para serem utilizados como genes de referência em análises de PCR em tempo real em feijoeiro. Não houve antecipação no processo de nodulação e fixação de N_2 pelas sementes com altos teores de P, indicada pela expressão dos genes *Enod40* e *leghemoglobina*. Entretanto o gene *Enod40* teve sua expressão aumentada após aplicação de P no substrato, sendo mais expresso em sementes com alto teor de P.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADER, M. D.; AL-SARRAF, H. A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR. **Developmental Brain Research**, v. 156, p. 38-45, 2005.
- ALMEIDA, J. P. F.; HARTWIG, U. A.; FREHNER, M.; NÖSBERGER, J.; LÜSCHER, A. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1289-1297, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- APPLEBY, C. A. The origin and functions of hemoglobin in plants. **Science Progress**, v. 76, p. 365-398, 1992.
- ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Ontogenetic variations on absorption and utilization of phosphorus in common bean cultivars under biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, v. 225, p. 1-10, 2000.
- ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; ALMEIDA, D. L. Variability of traits associated with phosphorus efficiency in wild and cultivated genotypes of common bean. **Plant and Soil**, v. 203, n. 2, p. 173-182, 1998.
- ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; LIMA, E. R. Efeitos do aumento do teor de fósforo na semente, obtido via adubação foliar, no crescimento e na nodulação do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 183-189, 2002.
- ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SA, F. M.; ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, v. 49, p. 1471-2229, 2010.
- ASAD, S.; FANG, Y.; WYCOFF, K. L.; HIRSCH, A. M. Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of MsENOD40: Transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. **Protoplasma**, v. 183, p. 10–23, 1994.
- BASTOLLA, F. M. Seleção e avaliação de genes de referencia para estudos de expressão gênica em Eucalyptus. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 112p. (Dissertação de Mestrado em Biologia celular e molecular).
- BERGMANN, H.; PREDDIE, E.; VERMA, D. P. S. Nodulin-35: A subunit of a specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. **EMBO (European Molecular Biology Organization)**, v. 2, p. 2333-2339, 1983.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.
- CÁRDENAS, L.; ALEMÁN, E.; NOREIDE, N. Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant. **Planta**, v. 223, p. 746–754, 2006.
- CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica do nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; BOREM, A.; PAULA JÚNIOR, T. J. (Ed.). **Feijão**. 2ed. Viçosa: Editora UFV, 2006, p. 251-312.

- CHAGAS, E.; ARAÚJO, A. P.; RODRIGUES, B. J.; TEIXEIRA, M. G. Seeds enriched with phosphorus and molybdenum improve the contribution of biological nitrogen fixation to common bean as estimated by ^{15}N isotope dilution. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p.1093-1101, 2010.
- CHARON, C.; SOUSSA, C.; CRESPI, M.; KONDOROSI, A. Alteration of enod40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. **Plant Cell**, v.11, p. 1953–1965, 1999.
- CHAUDHARY, M. I.; FUJITA, K. Comparison of phosphorus deficiency effects on the growth parameters of mashbean, mungbean, and soybean. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 44, p. 19-30, 1998.
- CHAVES, O. M. A. **O Comércio internacional de feijões: Oportunidades e desafios**. Goiás: EMBRAPA-CNPAP, 2010. 47 p. (EMBRAPA-CNPAP. Documento, 262).
- CHRISTIANSEN, I.; GRAHAM, P. H. Variation in dinitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. **Fields Crops Research**, v. 73, p. 133–142, 2002.
- CIAT. **Centro Internacional de Agricultura Tropical. Research constraints provisionally identified** by CIAT. In: Workshop On Advanced *Phaseolus* Beans Research Network, CIAT: Cali, p. 30, 1990.
- COOPER, J. B.; LONG, S. R. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. **Plant Cell**, v. 6, p. 215–225, 1994.
- CORICH, V.; GOORMACHTIG, S.; LIEVENS, S.; VANMONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Patterns of ENOD40 gene expression in stem-borne nodules of *S. rostrata*. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 67-76, 1998.
- CROMER, R. N.; CAMERON, D. N.; RANCE, S. J. Response to nutrients in *Eucalyptus grandis*. Biomass accumulation. **Forest Ecology and Management**, v. 62, p. 211-230, 1993.
- CULLIMORE J. V.; BENNETT M. J. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. **Plant Physiology**, v. 132, p. 387–393, 1998.
- CZECHOWSKI, T. S. M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, p. 5-17, 2005.
- EMBRAPA. **Cultivares de Feijão**. Empresa - Arroz e feijão, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/index.htm>>
- EMBRAPA. **Origem e História do Feijão**. Empresa - Arroz e feijão, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>>.
- ENDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation Approach to identify genes suites for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de Feijão**. Piracicaba: Ceres. 2007. 386p.
- FANG, Y. W.; HIRSCH, A. M. Studying early nodule gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. **Plant Physiology**, v. 116, p. 53–68, 1998.

- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de nutrientes. In: Fernandes, M. S. (ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 115-152.
- 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, 1988.
- FLEMETAKIS, E.; KAVROULAKIS, N.; QUAEDVLIEG, N. E. M.; SPAINK, H. P.; DIMOU, M.; ROUSSIS, A.; KATINAKIS, P. *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 987-994, 2000.
- FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 40-73, 2004.
- FUSCALDI, K.C.; PRADO, G.R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**. Ano XVI, v. 1, Jan-Mar. 2005.
- GILSBACH, R.; KOUTA, M.; BÖNISCH, H.; BRÜSS, M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. **BioTechniques**, v. 40, p. 173-177, 2006.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.
- GLOUDEMANS, T.; BISSELING, T. Plant gene expression in early stages Rhizobium-legume symbiosis. **Plant Science**, v. 65, p. 1-14, 1989.
- GORDON, A. J.; MINCHIN, F. R.; SKOT, L.; JAMES, C. L. Stress-induced decline in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. **Plant Physiology**, v. 114, p. 937-946, 1997.
- GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASSIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. **A importância do fosforo no desenvolvimento inicial da planta**. *Potafós*. Nº 95. Setembro, 2001.
- GRUZMAN, I.; DÖBEREINER, J. Anais da IV **Reunião Latino Americana Sobre Inoculantes para leguminosas**. Porto Alegre, p. 84, 1968. Modificado de NORRIS, O.D. Some concepts and methods in sub tropical pasture research. Maidenhead : Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops, p. 65, 1964.
- GUTIERREZ-BOEM, F. H.; THOMAS, G. W. Phosphorus nutrition and water deficits in field-grown soybeans. **Plant Soil**, v. 207, p. 87-96, 1998.
- HEIDSTRA, R.; BISSELING, T. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. **New Phytologist**, v. 133, p. 25-13, 1996.
- HEIDSTRA, R.; NILSEN, G.; MARTINEZ-ABARCA, F.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Nod factor-induced Expression of Leghemoglobin to Study the Mechanism of NH₄NO₃ Inhibition on Root Hair Deformation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 215-220, 1997.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, p. 19, 2007.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas de rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 339-364, 1994.

- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T. e HUNGRIA, M., (eds.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, Embrapa-CPAC, 1997. p.189-294.
- HUNT, S.; LAYZELL, D. B. Gas-Exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 483-511, 1993.
- IBGE. CENSO AGROPECUÁRIO, 1995. Instituto Brasileiro de geografia e estatística, Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/sidra>>, 2010.
- ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; DONALD, J.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 325-337, 2004.
- JAIN, M. N. A, TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646-651, 2006.
- KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Molecular Breeding**, v. 21, p. 159-172, 2008.
- KAVROULAKIS, N.; FLEMETAKIS, E.; AIVALAKIS, G.; KATINAKIS, P. Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, v. 14-22, 2000.
- KOUCHI, H.; TAKANE, K.; SO, R. B.; LADHA, J. K.; REDDY, P. M. Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. **Plant Journal**, v. 18, p. 121-129, 1999.
- KRISHNAN, H. B.; KUO, C. L.; PUEPKE, S. G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both nodD1 and nodD2, and is dependent on the cultivar-specificity locus, *nolXWBTUV*. **Microbiology**, New York, v. 11, p. 2245-2251, 1995.
- KUBOTA, F. Y. **Aumento dos teores de fósforo e de molibdênio em sementes de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) via adubação foliar**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 61p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo).
- KUMAGAI, H.; KINOSHITA, E.; RIDGE, R.; KOUCHI, H. RNAi knock-down of ENOD40s leads to significant suppression of nodule formation in *Lotus japonicus*. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 1102–1111, 2006.
- LADHA, J. K; REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, v. 252, p. 151–167, 2003.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- 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.
- LÓPEZ-BUCIO, J. L.; HERNÁNDEZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and

- causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. **Plant Physiology**, v. 129, p. 244-256, 2002.
- LYNCH, J. P.; BEEBE, S. E. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris*) to low phosphorus availability. **Horticultural Science**, v. 30, p. 1165-1171, 1995.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.
- MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. The “oxygen paradox” of dinitrogen-fixing bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 363–373, 2000.
- MATVIENKO, M.; VAN DE SANDE, K.; PAWLOWSKI, K.; VAN KAMMEN, A.; FRANSSEN, H.; BISSELING, T. *Nicotiana tabacum* SR1 contains two ENOD40 homologs. In: **Biology of Plant Microbe Interactions**. STACEY, G.; MULLIN, B.; GRESSHOFF, P. M. (ed). St. Paul USA, p. 387-391, 1996.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **Plant Cell**, v. 7, p. 869–885, 1995.
- OLDROYD, G. E.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 566-576, 2004.
- OLIVERA, M.; TEJERA, N.; IRIBARNE, C.; OCAÑÁ, A.; LLUCH, C. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 498–505, 2004.
- PINHEIRO, T. T. **Análise da expressão de genes associada à via de biossíntese de ácidos graxos em *Theobroma cacao* e ao acúmulo de ácido esteárico**. Piracicaba: CENA, 2009. 121p. (Dissertação de Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente).
- PFÄFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Letter**, v. 26, p. 509–515, 2004.
- RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, v. 274, p. 37-49, 2005.
- REID, K. E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S. T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC Plant Biology**, v. 6, p. 27-37,
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M.S. (ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 253-280.
- RIBET, J.; DREVON, J. J. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 1479-1486, 1995.
- ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O.; BINOTTI, F. F. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; FERNANDES, F. A. Avaliação da inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada no desenvolvimento do feijoeiro, sob sistema plantio direto. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 74-82, 2007.

- SA, T. M.; ISRAEL, D. W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 97, p. 928-935, 1991.
- SCHAHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: From Soil to Cell. **Plant Physiology**, v. 116, p. 447-453, 1998.
- SCHULZE, J.; TEMPLE, G.; TEMPLE, S. J.; BESCHOW, H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, v. 98, p. 731-740, 2006.
- SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RUMJANEK, N. G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p. 33-41, 2003.
- STOLF-MOREIRA, R.; MEDRI, M. E.; NEUMAIER, N.; LEMOS, N. G.; BROGIN, R. L.; MARCELINO, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 858-867, 2010.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 51p. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 94).
- STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. A Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 59 p. (Embrapa- Agrobiologia. Documento, 126).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 819p.
- TANG, C.; HINSINGER, P.; DREVON, J. J.; JAILLARD, B. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances próton release in roots of *Medicago truncatula* L. **Annals of Botany**, v. 88, p. 131-138, 2001.
- TAKEDA, N.; OKAMOTO, S.; HAYASHI, M.; MUROOKA, Y. Expression of *ljenod40* Genes in Response to Symbiotic and Non-symbiotic Signals: *ljenod40-1* and *ljenod40-2* are Differentially Regulated in *Lotus Japonicus*. **Plant Cell Physiology** v. 46, p. 1291-1298, 2005.
- TEIXEIRA, M. G.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; ARAÚJO, A. P.; FRANCO, A. A. Effect of seed phosphorus concentration on nodulation and growth of three common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.1599-1611, 1999.
- TWARY, S. N.; HEICHEL, G. H. Carbon cost of dinitrogen fixation associated with dry matter accumulation in alfalfa. **Crop Science**, v.31, p. 985-992, 1991.
- VADEZ, V.; LASSO, J. H.; BECK, D. P.; DREVON, J. J. Variability of N₂-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. **Euphytica**, v. 106, p. 231-242. 1999.
- VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v.157, p. 423-447, 2003.
- VANDESOMPELENE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.
- VERMA, D. P. S.; BALL, S.; GUERIN, C.; WANAMAKER, L. Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules. Characterization of the nascent and release peptides and relative rate of synthesis of the major leghemoglobins. **Biochemistry**, v. 18, p. 476-483, 1979.

VERMA, D. P. S.; HU, C. A.; ZHANG, M. Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. **Plant Physiology**, v. 8, p. 253-265, 1992.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 273-349.

VIJN, I.; YANG, W. C.; PALLISGARD, N.; OSTERGAARD JENSEN, E.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. VsENOD5, VsENOD12 and VsENOD40 expression during Rhizobium-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 1111–1119, 1995.

YANG, W. C.; KATINAKIS, P.; HENDRIKS, P.; SMOLDERS, A.; DE VRIES, F.; SPEE, J.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T.; FRANSSSEN, H. Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. **Plant Journal**, v. 3, p. 573-585, 1993.

ZHAO, S.; RUSSEL, F. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal Computational Biology**, v. 12, p. 1047-1064, 2005.

7. ANEXOS

7.1 Experimento I

Tabela 10 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea, número de nódulos, razão raiz:parte aérea,, massa de 1 aos 30 DAE.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de nódulos	Número de nódulos	Razão raiz:parte aérea	Massa de 1 nódulo
Psem	1	17666	10641*	327	822	70180*	11
Psol	4	147584***	9652**	5843***	45232***	35368*	9678
Sem x sol	4	10794	1460	87	2762	12991	6223
Erro	20	11999	1435	118	2214	11692	7435
CV (%)		13,54	11,18	14,67	23,77	20,43	22,49

Tabela 11 Análise de variância de teor de N da raiz e parte aérea aos 30 DAE.

Fonte de Variação	GL	Teor de N parte aérea	Teor de N na raiz
Psem	1	4021609***	22743
Psol	4	3448455***	95454**
Sem x sol	4	875701***	99299**
Erro	20	123065	15246
CV (%)		9.90	6.92

Tabela 12 Análise de variância de teor de N da raiz e parte aérea aos 43 DAE.

Fonte de variação	GL	Teor de N na parte aérea	Teor de N na raiz
Psem	1	6601	10830
Psol	4	105420	133740
Sem x sol	4	113435	4952
Erro	20	70021	74025
CV (%)		10.43	13.07

7.2 Experimento II

Tabela 13 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 3 DAE.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz
Psem	1	16.667	37.500
Erro	4	233.667	23.833
CV (%)		13.22	15.66

Tabela 14 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 5 DAE

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz
Psem	1	1837.50*	150.00*
Erro	4	125.00	3.33
CV (%)		7.24	4.03

Tabela 15 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 10 DAE.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de nódulos	Número de nódulos	Razão raiz:parte aérea	Massa de 1 nódulo
Psem	1	4219*	114.083	80.083**	2028.000**	6816	954
Psol	1	1704	18.750	0.750	8.333	7500	1344
Sem x sol	1	1180	6.750	18.750	161.333	176	660
Erro	8	711	44.417	6.583	158.917	3054	1285
CV (%)		12,15	12.10	14.46	17.63	16.43	14.51

Tabela 16 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea aos 15 DAE.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de nódulos	Número de nódulos	Razão raiz:parte aérea	Massa de 1 nódulo
Psem	1	18252.000**	261.333	16.333	1386.750*	8480.083*	9408.000
Psol	1	645.333	320.333*	147.000*	290.083	60.750	9976.333
Sem x sol	1	363.000	147.000	85.333	90.750	690.083	24843.000*
Erro	8	1003.583	59.500	25.000	288.917	884.167	2458.417
CV (%)		9.70	11.07	16.85	20.50	9.71	13.67

Tabela 17 Análise de variância da massa seca de raiz, parte aérea, número de nódulos, razão raiz:parte aérea, massa de 1 nódulo aos 25 DAE.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de nódulos	Número de nódulos	Razão raiz:parte aérea	Massa de 1 nódulo
Psem	1	50830*	2523.000	192.000	6302.083*	1027	9690
Psol	1	102860**	901.333	5208.333***	10620.750**	3640	37520*
Sem x sol	1	47502*	432.000	3.000	1064.083	11970	3104
Erro	8	7981	1218.083	99.167	679.250	3072	4144
CV (%)		12.48	23.35	15.48	15.15	18.12	17.35