**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o
desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar**

Soraya Gabriela Kiriachek

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Soraya Gabriela Kiriachek
Licenciado em Química com Orientação Agrícola

**Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o
desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Kiriachek, Soraya Gabriela

Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar / Soraya Gabriela Kiriachek. - - Piracicaba, 2008.
94 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Expressão gênica 3. Fosfatos 4. Fungos micorrízicos 5. Hormônios vegetais 6. Micorriza I. Título

CDD 633.61
K58i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

A Emiliano....lo mejor que hice en esta vida.

A mis viejos por la educación y apoyo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela oportunidade que me deu para poder fazer meu Doutorado.

A CAPES e FAPESP pelas bolsas concedidas.

A FAPESP pelo financiamento do Projeto.

A Coordenação do PPG de Microbiologia Agrícola e à ESALQ pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Carlos por ser meu companheiro e porque a pesar de tudo ainda estamos juntos e porque sem ele este trabalho não poderia ter chegado ao seu fim.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências Exatas da UNLPam por ter contribuído na minha formação e ter me dado a base para continuar na vida profissional.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular, aos que estão e aos que já passaram.

Aos técnicos do Laboratório de Solos e Microbiologia Molecular Denise, Fernando e Wladimir.

A Lorena, Alfredo e Ana por ter nos acolhido nesta ultima etapa e por ter nos oferecido tudo para poder concluir a tese.

A minha família pelos ensinamentos e o apoio. A meu irmão Alejandro que junto a Carina me deram ao Nicolás e a quem venha por ai fontes de apoio e alegria.

A todas as pessoas que conheci aqui no Brasil da comunidade estrangeira com os quais compartimos experiências e saudades de nossas terras.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão de literatura.....	12
2.1.1 A cana-de-açúcar.....	12
2.1.2 Micorrizas arbusculares: aspectos gerais.....	14
2.1.3 Desenvolvimento das MAs.....	15
2.1.4 Expressão gênica em MAs.....	19
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.2 Análise da expressão diferencial de genes envolvidos na simbiose micorrizas arbusculares.....	24
2.2.2.1 Instalação do experimento.....	24
2.2.2.2 Avaliação da colonização micorrízica.....	25
2.2.2.3 Extração de RNA	25
2.2.2.4 Biblioteca subtrativa supressiva	26
2.2.2.4.1 Isolamento do mRNA	26
2.2.2.4.2 Hibridização subtrativa supressiva	27
2.2.2.4.3 Clonagem dos fragmentos	28
2.2.2.4.4 Extração dos plasmídeos	28

2.2.2.4.5 Sequenciamento utilizando “dynamic et terminator”	29
2.2.2.4.6 Análises das bibliotecas.....	29
2.2.2.4.6.1 Análises das seqüências e anotação	30
2.2.2.4.7 Validação da expressão gênica da biblioteca subtrativa supressiva MS2 (genes induzidos na micorriza em condições de baixo P).....	30
2.2.2.4.7.1 Extração de RNA.....	30
2.2.2.4.7.2 Síntese da primeira fita de cDNA.....	31
2.2.2.4.7.3 Desenho dos primers para confirmação da expressão gênica diferencial	31
2.2.2.4.7.4 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	31
2.2.2.5. Análise de expressão gênica por hibridização em macroarranjos de cDNA.....	32
2.2.2.5.1. Preparação das membranas de alta densidade.....	32
2.2.2.5.2 Preparação da sonda e hibridização dos Macroarranjos	34
2.2.2.5.3 Análise dos resultados.....	34
2.2.2.5.3.1 Normalização dos dados de hibridização em macroarranjos de cDNA	34
2.2.2.5.3.2 Modelo estatístico.....	35
2.2.2.5.3.3 Análises de bioinformática.....	36
2.2.2.5.4 Validação dos resultados de hibridização em macroarranjos de cDNA por PCR quantitativo em tempo real.....	36
2.2.2.5.4.1 Extração de RNA	36
2.2.2.5.4.2 Síntese da primeira fita de cDNA.....	36
2.2.2.5.4.3 Primers usados para confirmar a análise da expressão gênica dos macroarranjos	36

2.2.2.5.4.4 Análise da expressão gênica dos macroarranjos de cDNA mediante PCR	
quantitativo	37
2.3 Resultados e discussão	38
2.3.1 Biomassa vegetal parte aérea.....	38
2.3.2 Colonização micorrízica.....	39
2.3.3 Identificação de genes com expressão diferencial em MAs através de	
hibridização subtrativa supressiva	40
2.3.4 Classificação das ESTs.....	41
2.3.5 Identificação de genes com expressão diferencial por hibridização subtrativa	
Supressiva	43
2.3.6 Identificação de genes com expressão diferencial por hibridização em macroarranjos	
de cDNA	57
2.3.7 Quantificação de acúmulo de transcritos de genes que apresentaram expressão	
diferencial expressos em macroarranjos por PCR quantitativo.....	72
3 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICES.....	92

RESUMO

Identificação e caracterização de genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em cana-de-açúcar

As micorrizas arbusculares (MAs) são associações simbióticas mutualísticas entre fungos da ordem Glomales e as raízes da maioria das plantas terrestres. Os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento e a eficiência da simbiose são pouco conhecidos, dificultando sua aplicação agrícola em larga escala. No entanto, a análise sistemática e em larga escala de genes expressos em raízes colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em diferentes condições ambientais poderia contribuir de forma significativa para o conhecimento da biologia dessa simbiose. O objetivo deste trabalho foi identificar genes com expressão induzida ou suprimida em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* em condições de baixo e alto fósforo (P) no substrato de cultivo, durante o desenvolvimento da simbiose. Usando hibridização subtrativa supressiva ("Suppressive Subtractive Hybridization", SSH) foram encontrados 74 genes com expressão diferencial significativa em raízes micorrizadas de 12 semanas após inoculação (SAI). Por outra parte, um total de 386 genes foram arranjados em membranas de nylon e sua expressão diferencial avaliada por sondas sintetizadas a partir de cDNA extraído em 4 SAI e 12 SAI. A hibridização em macroarranjos mostrou na presença da micorriza acúmulo diferencial de transcritos de genes codificando proteínas putativas envolvidas no metabolismo de jasmonato (COI1) e de etileno (ET) em raízes com 4 SAI, e ácido salicílico (AS) em raízes com 12 SAI. Dos genes que apresentaram acúmulo de transcritos regulados pela micorrização foram escolhidos 12 genes: que codificam cisteína protease (metabolismo de proteínas); remorina (dinâmica celular); dehidroascorbato redutase, e proteína rica em hidroxiprolina (resposta ao estresse); duas proteínas associadas a senescência; a horcolina (função não definida); COI1 (metabolismo de jasmonato); catalase, germina, glutatona (estresse oxidativo); quitinase (resposta de defesa), para análise de acúmulo de transcritos por qRT-PCR em 4, 6, 8, 10 e 12 SAI. Os resultados indicam que em etapas precoces do desenvolvimento das MAs são ativados genes que estão relacionados com a resposta ao estresse oxidativo e com metabolismo de fitohormônios, em etapas tardias esses genes mostraram diminuição no acúmulo de transcritos.

A análise dos padrões de expressão dos genes envolvidos no estabelecimento da simbiose poderia contribuir para elucidar os mecanismos genéticos que controlam a simbiose e poderiam facilitar a aplicação agrícola em larga escala dos FMAs

Palavras-chave: Micorriza arbuscular; Sinalização; Fitohormônios; Genes de defesa; Fósforo

ABSTRACT

Identification and characterization of genes differentially expressed during arbuscular mycorrhiza development in sugarcane

Arbuscular mycorrhizae (AM) are mutualistic symbiotic associations between fungi of the order Glomales and most of the terrestrial plants. The molecular mechanisms regulating AM development and efficiency are not well understood so that agricultural large scale application is so difficult. Although so many approaches are being used to the identification of differentially expressed genes in AMs, large scale analysis it must contributed to the knowledge of symbiosis molecular biology. The aim of this work was identify genes induced or suppressed in sugarcane roots colonized for *G. clarum* in low and high phosphorus (P) conditions, during symbiosis development. Using suppressive subtractive hybridization (SSH) was possible to detect 74 genes with differential significant expression in 12 weeks mycorrhized roots. In other hand a total of 386 genes were spotted into nylon membranes and differential expression was evaluated with probes of cDNA of 4 and 12 weeks. Macroarray hybridization shows increase of genes transcripts involved in jasmonate metabolism (COI1) and ethylene metabolism (ET) 4 weeks after inoculation, and in salicylic acid 12 weeks after inoculation. Twelve genes differentially expressed in mycorrhizal presences were choosen to analyse the expression with qRT-PCR in 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after inoculation. A cistein protease (protein metabolism); a remorin (cellular dynamic), dehydroascorbate reductase, hidroxiprolina rich protein (estress response); two proteins associated to senescence; a horcolin (unknown function); COI1 (jasmonate metabolism); catalase, germin, glutathione (oxidative estress); chitinase (defence response) were tested. The results showed that genes relationated with oxidative stress are activated in early stages of MAs development, and, in late stages these phytohormones metabolism related genes are suppressed. Patterns expression of genes involved in MAs development it must contributed to elucidate the genetics mechanisms controlling the symbiosis and it must facilitate large scale use of FMAs.

Keywords.: Arbuscular mycorrhiza; Signaling; Phytohormones; Defense genes; Phosphate

1 INTRODUÇÃO

As raízes das plantas são capazes de interatuar com uma ampla variedade de microrganismos do solo e da rizosfera, incluindo os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Esses fungos, pertencentes à ordem Glomales, em associação com as raízes das plantas formam as associações simbióticas mutualísticas mais amplamente distribuídas na natureza, chamadas micorrizas arbusculares (MAs). Tem se estimado que os FMAs são capazes de colonizar as raízes de 80% das plantas terrestres (SMITH; READ, 1997; SCHÜßLER et al., 2001), e contribuem para a maior absorção de fósforo e a redução de estresses bióticos e abióticos (GIANINAZZI-PEARSON, 1996; HARRISON, 1999). O processo de colonização das raízes pelos FMAs é dependente de um complexo mecanismo de troca de sinais, o qual resulta em mudanças no metabolismo dos simbiontes e na diferenciação de uma interface simbiótica específica no interior das células das raízes (HARRISON, 2005).

A cana-de-açúcar, umas das principais culturas do Brasil, é capaz de formar MAs com várias espécies de FMAs, sendo portanto importante estudar e entender quais são os processos que regulam essa interação. O Brasil é o maior produtor e exportador de álcool e açúcar do mundo, e a superfície plantada com cana-de-açúcar tem aumentado ano a ano. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas de manejo que resultem em menor impacto sobre a qualidade do ambiente é fundamental. Uma dessas técnicas alternativas de manejo da cultura de cana-de-açúcar seria a utilização de FMAs como biofertilizantes, para reduzir a utilização de fertilizantes solúveis na cultura (ORGANIZAÇÃO DE PLANTADORES DE CANA DO ESTADO DE SÃO PAULO-ORPLANA, 2004; COSTA, 2001; MATSUOKA et al., 1999). No entanto, os mecanismos que controlam o desenvolvimento das MAs em cana-de-açúcar são pouco conhecidos.

Para conhecer melhor o genoma da cana-de-açúcar foi criado em 1998 o projeto SUCEST, e no laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Ciência do Solo da USP-ESALQ foram construídas bibliotecas de cDNA de raízes micorrizadas com o objetivo de obter informações sobre genes que poderiam estar envolvidos no estabelecimento e funcionamento das MAs. Para a construção dessas bibliotecas foram usadas raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *Glomus clarum*, com oito semanas após a inoculação (SAI). Foram gerados 1925 ESTs, representando 1615 genes. Desses genes, 60% não apresentou homologia com seqüências depositadas no banco de dados do SUCEST, sugerindo um acúmulo de transcritos de genes que

são expressos na presença FMAs, possivelmente associados com as mudanças fisiológicas e bioquímicas na planta e no fungo que ocorrem durante a simbiose.

Diversos trabalhos têm mostrado a ocorrência de genes com expressão diferencial em MAs, mas a maioria desses trabalhos foram desenvolvidos em leguminosas que são capazes de estabelecer duas simbioses, as MAs e a simbiose com *Rhizobium* (LIU et al, 2003; MANTHEY et al., 2004; HOHNJEC et al., 2005; MASSOUMOU et al, 2007). Tem sido mostrado também que a ativação de alguns desses genes ocorre em células específicas e que sua expressão é modulada durante o desenvolvimento da simbiose, principalmente em leguminosas modelo, como *Medicago truncatula* (LIU et al, 2007). Portanto, é muito pouco o que se conhece sobre a regulação e desenvolvimento das MAs em gramíneas de importância econômica.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum*, durante o desenvolvimento da simbiose, mediante o seqüenciamento de ESTs, hibridização em macroarranjos de cDNA e PCR em tempo real.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi uma das primeiras culturas introduzidas no Brasil com fins lucrativos (LUCHESSI, 1995), e devido a isso é uma das mais importantes culturas agrícolas do ponto de vista sócio-econômico (ORPLANA, 2004). Sua importância econômica pode ser atribuída os seus múltiplos usos, podendo ser empregada como forragem para a alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool combustível e industrial (COSTA, 2001). No Brasil a cana-de-açúcar representa 6,2 milhões de hectares em área colhida, com produção na safra 2005/2006 de 423 milhões de toneladas de colmos (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2006). O Brasil é também líder na produção e exportação de derivados de cana-de-açúcar, dentre eles o etanol (MATSUOKA et al., 1999). A safra 2008/2009 prevê um aumento no processamento da cana-de-açúcar da ordem de 16% na região Centro-Sul, quando comparada com a safra 2007/008. A estimativa é que sejam processadas 498,1 milhões de toneladas de cana, produzindo 28,6 milhões de toneladas de açúcar (9% mais do que na safra anterior) e 24,3 bilhões de litros de etanol (19% a mais que os 20,3 bilhões da safra 2007/2008).

A exportação de etanol em 2009 também será aproximadamente 27% maior do que no ano anterior, com um volume de 3,9 bilhões de litros, destinado em grande parte aos Estados Unidos e Europa. Adicionalmente as exportações de açúcar em 2009 devem subir 15% (aproximadamente 18,9 milhões de toneladas), devido ao incremento do comércio com a Rússia, Arábia Saudita e Emirados Árabes (ORPLANA, 2008).

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma planta alógama (GRIVET; ARRUDA, 2001, VETTORE et al., 2001) da família *Gramineae* ou *Poaceae*, tribo *Andropogoneae*, gênero *Saccharum*, e provavelmente possui o genoma mais complexo de todas as gramíneas que têm sido estudada até agora, devido a seu alto grau de poliploidia (>10x) e sua origem interespecífica (D'HONT, 2005; GRIVET; ARRUDA, 2001). Os cultivares modernos de cana-de-açúcar derivam

da combinação das espécies poliplóides *Saccharum officinarum*, espécie produtora de açúcar com $n=10$ e $2n=80$, e *Saccharum spontaneum*, uma espécie selvagem com $n=8$ e $2n = 40$ a 128 e várias formas aneuplóides (D'HONT et al., 1998; SREENIVASAN et al., 1987). As variedades modernas derivadas dos cruzamentos interespecíficos destas espécies são altamente poliplóides (mais do que decaplóide) e aneuplóides, com cerca de 120 cromossomos (SREENIVASAN et al., 1987) os genomas desses híbridos tem aproximadamente 10.000 Mb (D'HONT, 2005) e complexo comportamento meiótico. Por esse motivo é a espécie menos caracterizada do ponto de vista genético dentre os membros da família Poaceae. .

Estudos de citogenética molecular (CUADRADO et al., 2004; D'HONT et al., 1996; PIPERIDIS; D'HONT, 2001) e mapeamento gênico (GRIVET et al., 1996; HOARAU et al., 2001) demonstraram que os cultivares modernos têm 70-80% dos cromossomos derivados de *S. officinarum* e 10-20% de *S. spontaneum*, e poucos cromossomos derivados da combinação interespecífica (JANOO, et al., 2007; LU et al., 1994). Entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, o mapeamento gênico tem mostrado uma ampla sintenia e colinearidade (GRIVET et al., 1996; MING et al., 1998).

O entendimento da evolução do genoma de cana-de-açúcar tem aumentado mediante as análises de seqüências comparando os genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A poliploidização é seguida por uma ampla e rápida alteração genômica que inclui silenciamentos gênicos massivos e a eliminação de genes duplicados (ADAMS; WENDEL, 2005). Com o intuito de compreender melhor o genoma da cana-de-açúcar, o consórcio ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis), financiado pela FAPESP, iniciou o projeto SUCEST, gerando um banco de dados contendo aproximadamente 238.000 ESTs provenientes de 26 bibliotecas de cDNAs construídas a partir de diversos órgãos e tecidos da cana-de-açúcar em diferentes fases de desenvolvimento (ARRUDA, 2001). Os dados obtidos contribuíram para obter marcadores moleculares de interesse para a agricultura e prover bases moleculares para o estudo de processos de desenvolvimento e crescimento da planta. Os clones de cDNA têm sido utilizados para a construção de microarranjos para o estudo da expressão e regulação gênica em diferentes tecidos da cana-de-açúcar sob diferentes condições ambientais.

2.1.2 Micorrizas Arbusculares: aspectos gerais

Os FMAs pertencem à ordem Glomales (Zigomicetos) do filo Glomeromycota, e se agrupam em sete gêneros: *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* e *Scutellospora*, com aproximadamente 160 espécies já descritas (INVAM, 2004; SCHÜßLER et al., 2001). Os FMAs são simbiotróficos obrigatórios, pois completam seu ciclo de vida apenas se estiverem associados a uma planta hospedeira, a qual lhes fornece carboidratos e outros fatores necessários ao seu desenvolvimento e esporulação (SIQUEIRA et al., 2002). Os esporos dos FMAs podem germinar independentemente da presença da planta hospedeira, mas o crescimento da hifa é muito limitado (AKIYAMA, 2007). Esse limitado crescimento pode ser hipoteticamente pelo fato de que durante o transcurso da evolução os FMAs transferiram funções essenciais para o genoma da planta, trocando assim a capacidade de replicação independente pela proteção contra condições adversas no solo que lhe forneceu o nicho ecológico da raiz (BRUNDRETT, 2002).

A associação simbiótica que os FMAs são capazes de estabelecer com as plantas é chamada de micorrizas arbusculares (MAs), as quais têm sido associadas à capacidade das plantas em colonizar o ambiente terrestre durante o processo evolutivo. As MAs são caracterizadas pelo crescimento inter- e intracelular das hifas de FMAs no tecido cortical das raízes da maioria das espécies vegetais, e pela diferenciação de hifas intracelulares terminais em estruturas chamadas arbúsculos (BONFANTE-FASOLO, 1984). Estas estruturas são efêmeras, de ciclo curto (4-5 dias), e responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbiontes (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). De maneira geral, as MAs promovem maior absorção e utilização de nutrientes do solo, principalmente fósforo (P) (FINLAY, 2004; LANDERWEET et al., 2001; AHONEN-JONNARTH et al., 2000; ROSLING et al., 2003; ROSLING et al., 2004). MAs têm sido também associadas ao aumento da nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas (FINLAY, 2004), o biocontrole de certos patógenos e pragas, e à diminuição dos estresses hídricos (AHONEN-JONNARTH et al., 2003) e por metais pesados (HILDEBRANDT et al., 2007). As MAs podem ter ação bioreguladora, atuando na produção e acúmulo de substâncias reguladoras do crescimento, interferindo favoravelmente na relação água-planta (QUEREJETA et al., 2003) e acumulando certos metabólitos secundários (SIQUEIRA et al., 2002). Nas plantas colonizadas por FMAs, a taxa fotossintética líquida é maior e a relação fonte-dreno é alterada, em relação às plantas não-colonizadas. Até 20% do carbono fixado via fotossíntese pode ser translocado para as raízes em

associação com FMAs (DOUDS; JOHNSON; KOCH, 1988; GRAHAM, 2000; TINKER; DURALL; JONES, 1994).

Sabe-se de longa data que a concentração de P nas plantas tem grande efeito no desenvolvimento da simbiose (SMITH; READ, 1997). Em condições de baixa concentração de P, a simbiose se desenvolve plenamente, enquanto que em condições de alto P, seu desenvolvimento é restrito. Os mecanismos pelos quais o P regula o desenvolvimento da simbiose são desconhecidos. O avanço das pesquisas nessas áreas tem sido limitado principalmente pela impossibilidade de manipulação genética dos FMAs. No entanto, os mecanismos pelos quais a simbiose se desenvolve ainda estão longe de serem compreendidos, mas com o desenvolvimento de pesquisas que tentem explicar o processo será possível manipular esta interação para melhorar os benefícios agronômicos por ela conferidos.

2.1.3 Desenvolvimento das MAs

A formação de uma MA funcional é um processo altamente regulado, o qual é acompanhado por modificações bioquímicas em ambos os organismos durante a simbiose (LIU et al., 2003; MARTIN-LAURENT et al., 1997). O primeiro passo para o desenvolvimento da simbiose é o reconhecimento mútuo entre a planta e o fungo que se inicia antes do contato físico entre os parceiros. Nesta etapa, genes envolvidos em vias de transdução de sinais são induzidos, resultando no reconhecimento do FMA e desenvolvimento da simbiose. A raiz do hospedeiro libera moléculas sinais que induzem o desenvolvimento das hifas (BUÉE et al., 2000), bem como a síntese e liberação de moléculas sinalizadoras do fungo que ativam genes específicos da simbiose na planta (CHABAUD et al., 2002; KOSUTA et al., 2003). Estudos recentes realizados com *M. truncatula* permitiram isolar uma molécula responsável pela ramificação da hifa de *Gigaspora margarita*. Essa molécula foi identificada como 5-desoxi-estrigol, uma estrigolactona do grupo dos sesquiterpenos lactonas derivada da via de produção de carotenóides (MATUSOVA et al., 2005; AKIYAMA et al., 2005). As estrigolactonas podem estimular a ramificação de hifas, mas a sua essencialidade para a formação das MAs ainda não foi demonstrada. Em raízes de pepino micorrizadas com *Glomus caledonium* foi demonstrado a ocorrência de acúmulo de triterpenóides (AKIYAMA; HAYASHI, 2002). Desses triterpenóides, o ácido 2 β -hidroxibriônólico e o ácido 3 β -brioférúlico foram isolados por cromatografia em coluna e caracterizados mediante análises

espectrométricas (AKIYAMA; HAYASHI, 2002; AKIYAMA, 2007). Foi demonstrado que o acúmulo desses ácidos está relacionado com os microrganismos do solo contidos no inóculo dos FMAs, e as MAs promovem o acúmulo de terpenos nas raízes. A função desses triterpenóides nas interações plantas-microrganismos ainda não foi elucidada (AKIYAMA; HAYASHI, 2002).

O fato de alguns mutantes de leguminosas não-nodulantes (*nod*⁻) serem incapazes de formar MAs (*myc*⁻) sugere que parte das vias de transdução de sinais nas duas simbioses é comum (LAMBAIS, 2006). Pelo menos três genes essenciais para a nodulação são também essenciais para a formação de MAs, são os chamados *DMI* (*Does not Make Infection*), identificados em *M. truncatula*. Os mutantes *dmi* de *M. truncatula* e os *Ljsym* de *L. japonicus* são fenotipicamente similares ao primeiro mutante *myc*⁻ de ervilha, e têm o processo de infecção bloqueado no estágio de penetração das células epidérmicas (HARRISON, 2005), sugerindo que os produtos desses genes estão envolvidos nas fases iniciais do processo de percepção e transdução dos sinais moleculares.

De fato, o gene *DMI2* de *M. truncatula* e seu ortólogo *SYMRK* de *L. japonicus* codificam receptores transmembrânicos com atividade de quinase de proteínas essenciais para a formação das MAs e nódulos (STRACKE et al., 2002). A caracterização do gene *SYMRK* permitiu a identificação de um domínio extracelular rico em leucina que estaria envolvido na percepção de moléculas sinais (fator Nod e/ou um possível fator Myc), um domínio transmembrânico e um domínio quinase de proteína intracelular, o qual permite a transdução dos sinais moleculares (YOSHIDA; PARNISKE, 2005). A fosforilação de três resíduos serina/treonina do domínio quinase de proteína intracelular foi descrita como essencial para a completa ativação do receptor e transdução do fator Nod (YOSHIDA; PARNISKE, 2005). Porém, o complexo protéico necessário para o reconhecimento do fator Nod é formado pelo produto de dois outros genes: *LjNFR1* e *LjNFR5*. Esses genes codificam proteínas similares a receptores transmembrânicos com atividade de quinase de proteínas. Mutantes *nfr1* e *nfr5* não respondem aos fatores Nod, mas podem formar MAs, i.e., são *nod*⁻ *myc*⁺. Esses dados sugerem que essas proteínas estão especificamente envolvidas na percepção do sinal bacteriano, e não interferem na percepção do fator Myc (RADUTOIU et al., 2003; MADSEN et al., 2003).

Outro gene essencial para o desenvolvimento de nódulos e MAs em *M. truncatula* é *DMI1* (ANÉ et al., 2004; ENDRE et al., 2002). A proteína codificada por *DMI1* atua após *DMI2/SYMRK*

na cascata de transdução do sinal molecular, e codifica um canal de cátions putativo, possivelmente envolvido na oscilação da concentração de Ca^{+2} (“ Ca^{+2} spiking”) no citoplasma vegetal (OLDROYD; DOWNIE, 2004). Em raízes de *M. truncatula*, a proteína DMI1 está localizada na membrana nuclear (RIELY et al., 2007). Porém, dois genes homólogos à *DMI1*, *CASTOR* e *POLLUX*, identificados em *L. japonicus* codificam proteínas localizadas em plastídios, podendo não ser as responsáveis pela oscilação da concentração de Ca^{+2} no citoplasma (IMAIZUMI-ANRAKU et al., 2005). Oscilações na concentração de Ca^{+2} no citoplasma são essenciais para o desenvolvimento dos nódulos, mas a sua essencialidade, para a formação de MAs ainda não foi demonstrada. O fato de o gene *Nup133* de *L. japonicus*, o qual codifica uma nucleoporina localizada no envelope nuclear das células das raízes, ser necessário para as oscilações de Ca^{+2} , aliado ao fato de mutantes *nup133* não formarem MAs, sugere que as oscilações de Ca^{+2} são também essenciais para o desenvolvimento de MAs (KANAMORI et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que um sinal difusível secretado por FMAs provoca um aumento transiente do cálcio citossólico e uma resposta rápida nas células de *Glycine max* na presença de esporos de *Gigaspora margarita* (NAVAZIO et al., 2006). Esses resultados sugerem que tanto a planta quanto o fungo produzem um sinal difusível que é independente do contacto físico e que são essenciais para o estabelecimento das MAs (NAVAZIO et al., 2006).

O terceiro gene essencial para o desenvolvimento de MAs em *M. truncatula* é *DMI3*. Esse gene possui alta similaridade com genes que codificam quinases de proteínas dependentes de cálcio e calmodulina (CCAMKs – *calcium/calmodulin-dependent protein kinases*), cuja localização é nuclear. Mutantes *dmi3* apresentam oscilações da concentração de Ca^{+2} no citoplasma, mas não expressam genes de nodulinas precoces. É possível que *DMI3* seja essencial para o reconhecimento dos padrões das oscilações da concentração de Ca^{+2} no citoplasma e ative fatores de transcrição específicos para a regulação de genes envolvidos em nodulação, como *NSP1* e *NSP2*, e para a formação de MAs, ainda desconhecidos (LEVY et al., 2004; LAMBAIS, 2006).

As respostas de mutantes *dmi1*, *dmi2* e *dmi3* em *M. truncatula* a fatores Nod e um fator Myc difusível, avaliadas utilizando-se o sistema repórter *MtENOD11-gusA*, sugerem que os genes *DMI* não são essenciais para a expressão de *MtENOD11* induzida pelo fator Myc difusível, como o são pelo fator Nod (KOSUTA et al., 2003). Esses dados sugerem também que existem pelo menos dois fatores Myc, um produzido no ponto de contato entre os simbiontes e transduzido através de

uma via dependente de *DMI*, e outro difusível, transduzido através de uma via independente de *DMI* (LAMBAIS, 2006; KISTNER et al., 2005).

O processo de infecção ocorre a partir do contato das hifas infectivas com as raízes das plantas. A formação do apressório inicia-se logo após o contato da hifa com a superfície da raiz e envolve trocas de sinais bioquímicos e topográficos entre os simbiossiontes (GIANINAZZI-PEARSON; BRECHENMACHER 2004; REQUENA et al., 2002). A formação do apressório é observada somente em presença de tecidos de raízes, não sendo observada em superfícies sintéticas quando aplicados os exsudados radiculares que estimulam o crescimento das hifas (HARRISON, 1999). No entanto, já foi demonstrado que *Gigaspora margarita* forma apressório *in vitro* sobre a parede de células epidérmicas isoladas de raízes de cenoura (planta hospedeira), mas não sobre paredes isoladas de células epidérmicas de raízes de beterraba açucareira (planta não-hospedeira) (NAGAHASHI; DOUDS, 1997). Também foi observado que o fungo reconhece o tipo de célula, sendo incapaz de formar o apressório sobre a parede de células corticais e vasculares (GADKAR, 2001). O apressório formado em fragmentos da parede celular desenvolve hifas, as quais não penetram completamente na célula, o que sugere que o próximo passo para o desenvolvimento do arbúsculo requer células intactas (HARRISON, 1999). Assim, os sinais moleculares para a formação do apressório estão presentes na epiderme da parede celular, mas os componentes necessários para o desenvolvimento pleno das MAs estão em células íntegras e ainda não foram completamente elucidados (GADKAR, 2001; HARRISON, 1999). A penetração e o crescimento do fungo são pré-requisitos para a colonização e o desenvolvimento de arbúsculos no córtex (GENRE; BONFANTE 2002). Os arbúsculos são as estruturas responsáveis pela troca de metabólitos entre os simbiossiontes (BONFANTE, 1984; GENRE; BONFANTE, 2002; HARRISON et al., 2002).

As análises de mutantes de *L. japonicus* têm mostrado que a colonização das raízes por FMAs é controlada em três pontos: 1) abertura das células superficiais da epiderme, 2) passagem intracelular através da exoderme da raiz e, 3) formação dos arbúsculos nas células corticais mais internas (DEMCHENKO et al., 2004). Demchenko et al. (2004) demonstraram que o gene *SYM15* é requerido para a abertura da superfície e para a formação do arbúsculo. As raízes de mutantes defectivos no gene *sym15-2* de *L. japonicus* não apresentam abertura das células da epiderme na presença de hifas de *Glomus intraradices*, bloqueando a penetração do fungo (DEMCHENKO et

al. 2004; KISTNER et al., 2005). Os mutantes *sym2*, *sym3* e *sym4* de *L. japonicus* não são capazes de formar MAs, pois a infecção está bloqueada na passagem intracelular pela exoderme, impossibilitando a colonização das células corticais (WEGEL et al., 1998; DEMCHENKO et al., 2004), provavelmente devido ao acionamento do sistema de defesa vegetal nas células do hospedeiro com conseqüente morte das mesmas (BONFANTE, 2000).

O desenvolvimento e eficiência simbiótica das MAs são altamente regulados pelo P. Embora os mecanismos envolvidos na regulação das MAs pelo P não sejam conhecidos, existem evidências mostrando que essa regulação depende do *status* nutricional da parte aérea (SMITH; READ, 1997; BOLAN, 1991). Lambais e Mehdy (1995) sugerem um modelo para explicar o mecanismo do controle da simbiose, envolvendo o P, fitohormônios e o sistema de defesa vegetal. Alterações no balanço hormonal causadas pela infecção, assim como baixos níveis de P na planta, poderiam resultar na supressão do sistema de defesa vegetal, possibilitando o estabelecimento da simbiose. De maneira inversa, altos níveis de P poderiam induzir a expressão de certas proteínas de defesa específicas, inibindo o crescimento fúngico intrarradicular.

2.1.4 Expressão gênica em MAs

Existe um amplo acervo bibliográfico de trabalhos destinados a identificar genes que são regulados diferencialmente na presença das MAs em respostas ao P. Muitas destas investigações incluem análise da expressão de genes conhecidos por serem induzidos durante outras interações planta-microrganismo, tais como genes de defesa vegetal (MALDONADO-MENDOZA et al., 2002).

Para identificar genes expressos diferencialmente na simbiose têm sido utilizadas técnicas como o “screening” diferencial de bibliotecas de cDNA, “display” diferencial de mRNA (hibridização subtrativa supressiva), macroarranjos de cDNA e PCR em tempo real. Essas abordagens permitiram a identificação de vários genes cujas funções na simbiose foram ou estão sendo determinadas (LAPOPIN; FRANKEN, 2001; FRANKEN; REQUENA, 2001; DELP et al., 2000).

A formação de MAs modifica significativamente a expressão de diferentes genes nas raízes de leguminosas como *M. truncatula* (HOHNJEC et al., 2005; MANTHEY et al., 2004; MASSOUMOU et al., 2007) e *L. japonicus* (DEGUCHI et al., 2007). Em gramíneas, as análises de transcritos de *O. sativa* por hibridização em microarranjos mostrou que os genes que são regulados na formação de MAs são conservados em mono e dicotiledôneas (GÜMIL et al., 2005).

Em raízes de *M. truncatula* micorrizadas genes relacionados com processos de transporte de membrana e transporte de nutrientes, degradação e modificação da parede celular, metabolismo primário e secundário, transdução de sinais e regulação da transcrição, normalmente apresentam expressão induzida, em relação a raízes não-micorrizadas, enquanto que genes relacionados com as respostas de defesa são suprimidos (HOHNJEC et al., 2005; MASSOUMOU et al., 2007). O gene *MtPt4*, codificando um transportador de fosfato (HARRISON, 2002) e gene codificando uma aquaporina similar a Nodulina 26 (BRECHENMACHER et al., 2004) apresentaram expressão induzida tanto em *M. truncatula* (HOHNJEC et al., 2005) quanto em *O. sativa* micorrizadas (GÜMIL et al., 2005). Burleigh e Harrison (1996) observaram que o gene *MtPt4* é diferencialmente regulado por P e pela colonização micorrízica. *MtPt4* é induzido pela baixa disponibilidade de P e suprimido pela adubação fosfatada e pela colonização micorrízica. Recentemente foi demonstrado que a função do *MtPt4* é crítica para a formação das MAs. A perda da função deste gene provoca a morte prematura dos arbúsculos e o fungo não é capaz de colonizar a raiz, interrompendo a simbiose. Com esses resultados pode-se concluir que o transporte de P inorgânico é benéfico para a planta, mas também é requerido para o desenvolvimento da simbiose (JAVOT et al., 2007). Um transportador de hexose *MtSt1*, relacionado com o transporte de nutrientes, também teve sua expressão induzida em raízes de *M. truncatula* micorrizadas, em relação a raízes não micorrizadas (HARRISON, 1996).

Entre os genes relacionados com a degradação e a modificação da parede celular que apresentam expressão induzida em raízes micorrizadas de *M. truncatula* estão os genes codificando uma endo-1,4- β -glucanase, uma proteína similar a osmotina/taumatina e uma proteína rica em prolina. Também foi demonstrado que a micorização em raízes de *M. truncatula* induziu a expressão de uma proteína similar a germina MtGlp1 (DOLL et al., 2003), uma serina carboxipeptidase MtScp1 (LIU et al., 2003), a 1-desoxi-D-xylulose-5-fosfato sintase (WALTER et al., 2002).

Para medir o efeito que poderia ter a espécie e o gênero de fungo utilizado para a colonização no acúmulo diferencial de transcritos, raízes de *M. truncatula* foram inoculadas com diferentes espécies de FMAs e submetidas a diferentes tratamentos (fertilização fosfatada, interações com microrganismos benéficos e patogênicos e incompatibilidade no genótipo da planta) (MASSOUMOU et al., 2007). Dos transcritos que foram analisados, utilizando-se microarranjos de cDNA, vários apresentaram expressão diferencial, dentre eles genes relacionados com o metabolismo secundário, como citocromo P450, genes relacionados com as respostas de defesa, como uma proteína antifúngica rica em cisteína e inibidores 1, 2 e 3 do tipo tripsina Kunitz, genes relacionados com a síntese e processamento de proteínas, como serina protease e um inibidor da subtilisina, genes codificando uma lectina de leguminosa, um precursor de lipase e uma proteína com função desconhecida homóloga com a proteína Mlo (MASSOUMOU et al., 2007). O acúmulo diferencial de transcritos variou em função da espécie e o gênero do FMA utilizado (MASSOUMOU et al., 2007).

Lambais e Medhy (1993) observaram aumento transiente seguido de supressão no nível de mRNA de duas isoformas de endoquitinases em raízes de feijão colonizadas por *G. intraradices*. O mesmo efeito foi observado na atividade de guaiacol peroxidase, fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcone isomerase (CHI) (LAMBAIS et al., 2003; VOLPIN et al., 1994). Também foi observada a supressão da expressão da β -1,3-glicanases, CHI e PAL após o estabelecimento da simbiose. As maiores reduções nos níveis de expressão foram observadas em plantas em condições de baixo P, reforçando o fato da importância da concentração de P na planta como agente regulador da interação hospedeiro-FMA (LAMBAIS; MEDHY 1993). Análises por hibridização de transcritos reversos com macroarranjos de cDNA de raízes de *L. japonicus* colonizadas por *Glomus mosseae* e *Gigaspora margarita* mostraram que a micorrização induziu quatro genes codificando cisteína proteases. A hibridização “*in situ*” mostrou que três desses genes foram expressos especificamente nas células corticais que possuíam arbúsculos (DEGUCHI et al., 2007). Genes que estão relacionados com a biosíntese dos fenilpropanóides, como fenilalanina amônia liase (PAL) a chalcona sintase, foram suprimidos em etapas tardias do desenvolvimento da simbiose em raízes micorrizadas de *L. japonicus*, embora sejam induzidos moderadamente no início da associação.

O possível efeito de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) no controle da colonização intraradicular por FMAs foi estudada em plantas transgênicas de tabaco. A expressão

constitutiva dos genes PR1, PR3, PR4 e PR5 não afetou o nível de colonização por *G. mosseae*, demonstrando que há uma resposta de defesa atenuada na presença de FMAs (VIERHEILIG et al., 1995). Em outro experimento, estes mesmos genes foram menos expressos em raízes colonizadas por *G. mosseae*, quando comparadas às plantas infectadas com *Phytophthora parasítica* (DASSI et al., 1998).

Também foram observados aumentos na expressão dos genes que codificam enzimas da via do ácido jasmônico em raízes micorrizadas (HAUSE et al., 2002; LIU et al., 2003). Genes codificando quitinases, glutathione S-transferase, proteínas ricas em prolina, proteínas arabinogalactano e tubulina também apresentam expressão modulada em MAs (SALZER et al., 2000; JOURNET et al., 2001; WULF et al., 2003). No entanto, seus papéis no controle da simbiose não foram demonstrados (RAUSCH et al., 2001; HARRISON et al., 2002; PASZKOWSKI et al., 2002).

Dessa forma, a análise em larga escala da expressão gênica em plantas micorrizadas, sob diferentes condições e em diferentes etapas do desenvolvimento, é de fundamental importância para desvendar os mecanismos de regulação dessa simbiose. Normalmente, leguminosas como ervilha, *M. truncatula* e *L. japonicus* têm sido utilizadas para esclarecer os mecanismos regulatórios comuns ao desenvolvimento de nódulos fixadores de nitrogênio e MAs (WULF et al., 2003; MANTHEY et al., 2004; LIU et al., 2003). Em nosso laboratório, está sendo utilizada a cana-de-açúcar para os estudos de regulação gênica em MAs, em razão da disponibilidade de um grande banco de dados de ESTs de vários tecidos de cana-de-açúcar gerados pelo SUCEST, e da escassez de informações que há sobre o desenvolvimento de MAs em gramíneas.

A hipótese de nosso trabalho é que existem genes que são diferencialmente expressos durante o desenvolvimento das MAs em cana-de-açúcar e que esses genes estão associados principalmente a estresse oxidativo, metabolismo hormonal e respostas de defesa vegetal.

Os objetivos deste trabalho são:

- Identificar genes com expressão diferencial, em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em condições de baixo e alto P no solo, durante os estádios tardios de desenvolvimento da simbiose mediante a construção das bibliotecas SSH.
- Analisar a expressão gênica em MAs com quatro e doze semanas de desenvolvimento em baixas condições de P, usando macroarranjos originados de clones de

cDNA de MAs previamente caracterizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ, e com expressão diferencial putativa.

- Analisar o acúmulo de transcritos dos genes de interesse encontrados nas SSH e nos macroarranjos em diferentes tempos de desenvolvimento mediante PCR quantitativo para validar os resultados obtidos.

2.2 Material e Métodos

2.2.2 Análise da expressão gênica diferencial em micorrizas arbusculares

2.2.2.1 Instalação do experimento

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* c.v. SP80- 3280 F3) provenientes do Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, Piracicaba, São Paulo, foram plantadas em bandejas de isopor contendo substrato esterilizado composto por areia lavada + vermiculita (2:1, v/v).

Após o período de aclimação, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo 1 kg do substrato e adubadas com: 240 mg de N na forma de nitrato de amônio ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$), dividido em três aplicações a cada 20 dias, 300 mg de K na forma de fosfato de potássio (KH_2PO_4), 120 mg de Ca na forma de cloreto de cálcio (CaCl_2), 60 mg de Mg na forma de sulfato de magnésio (SO_4Mg), 1 ml de solução de Fe-EDTA e 1 ml de solução de micronutrientes de Hoagland por vaso (Sarruge, 1975). A adubação fosfatada foi feita com 20 ou 200 mg P kg^{-1} substrato na forma de fosfato de potássio (KH_2PO_4), representando baixo e alto P, respectivamente.

A inoculação com o fungo micorrízico *Glomus clarum* foi realizada no momento do transplantio. O inóculo (aproximadamente 5 ml) era constituído de uma mistura de solo, esporos fúngicos e fragmentos de hifas e raízes de *Brachiaria decumbens* colonizadas, obtidas de vasos de multiplicação. As plantas controle receberam mistura de solo e raízes de *Brachiaria* não-colonizadas. O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP.

A colheita do experimento foi feita 4, 6, 8, 10 e 12 semanas após o transplantio. A parte aérea foi seca a 70°C até atingir massa constante, para a determinação da massa da matéria seca da parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente e o excesso de umidade foi removido com

papel absorvente. Após obtenção da massa fresca, as raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C .

2.2.2.2 Avaliação da colonização micorrízica

As raízes foram separadas das plantas e lavadas em água corrente. Subamostras do terço médio do sistema radicular foram coletadas e armazenadas em etanol 70%. O conteúdo citoplasmático foi removido com KOH 10% por 60 minutos a 90°C e as raízes foram coradas com tinta de caneta Parker® 5% (v/v) diluída em solução de ácido acético a 90°C por 3 minutos, lavadas em ácido acético 5% (v/v) e armazenadas em lactoglicerol (Vierheilig et al., 1998). A taxa de colonização foi determinada pela presença de estruturas fúngicas no tecido cortical, utilizando-se um microscópio estereoscópico (aumento de 72 vezes) e placas reticuladas, de acordo com Giovanetti e Mosse (1980).

2.2.2.3 Extração de RNA

Uma alíquota de 1 g das raízes de cana-de-açúcar foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido, e o RNA foi extraído utilizando-se 7,5 ml de uma Solução Monofásica (38% de Fenol, 0,8M de Tiocianato de Guanidina, 0,4M de Tiocianato de amônio, 0,1M de Acetato de Sódio pH 5,5 e 5% de Glicerol), de acordo com Takahashi (2005). As raízes foram homogeneizadas com agitação vigorosa por 1 min e incubadas a 30°C por 10 min para inibir as RNases. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 ml limpos onde foi adicionado 1/5 de volume de clorofórmio, as amostras, foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 4 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para microtubos de 1,5 ml novos e foi adicionado 1/3 de volume de SSC (0,8 M de citrato de sódio e 1,5 M de cloreto de sódio) e 2/3 de volume de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas durante a noite a -20°C e centrifugadas a 14.000 g por

15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com etanol 70%. O RNA peletizado foi seco por 10 min a 37°C e solubilizado em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

A concentração e pureza de RNA total foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm (A_{260}) e 280 nm (A_{280}). A absorbância de uma unidade a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por ml. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2%, utilizando-se brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) para visualização do mesmo (Sambrook et al., 1989). A aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro “FluorImager SI” (GE Healthcare).

2.2.2.4 Biblioteca subtrativa supressiva

2.2.2.4.1 Isolamento do mRNA

Amostras de raízes após 12 semanas de inoculação e cultivadas em condições de alto e baixo P foram utilizadas para a purificação do mRNA utilizando-se o kit Oligotex (Quiagen). O RNA total extraído foi armazenado em 1/10 volume de 3M Acetato de sódio pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol 100% e precipitado e recuperado por centrifugação a 14.000g por 30 minutos a 4°C. O pélete obtido foi lavado com etanol 70% e seco por 10 minutos a 37°C. O RNA foi então solubilizado com até 250 µl de água-DEPC. A quantificação foi feita por espectrofotometria a 260 nm. De acordo com a quantidade de RNA total obtida, foi adicionado água-DEPC, tampão OBB e suspensão da resina Oligotex. Esta solução foi incubada por 3 minutos a 70°C para quebrar as estruturas secundárias do RNA e incubadas novamente por 10 minutos a temperatura ambiente. O complexo formado pelo mRNA ligado à resina Oligotex foi peletizado por centrifugação a 14000g por 2 min e o sobrenadante foi descartado. O complexo Oligotex:mRNA foi ressuspensionado em tampão OW2 e filtrado em coluna de intercambio (Millipore). O eluato recolhido foi descartado, e o procedimento repetido mais uma vez. Para a eluição do mRNA, foi adicionado 100 µl de tampão OEB aquecido a 70°C. Ao eluato obtido foi adicionado 1/20 volume de glicogênio ($50\mu\text{g ml}^{-1}$),

1/10 volume de acetato de amônio 7,5M e 2,5 volumes de etanol 100%. O mRNA poliA(+) foi precipitado a -80°C durante 12h.

2.2.2.4.2 Hibridização subtrativa supressiva

A técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH), desenvolvida por Diatchenko *et al.* (1996), permite o isolamento de cDNAs sintetizados a partir de mRNAs presentes em uma população, mas não em outra. Inicialmente ambas as populações de mRNA foram convertidas em cDNA: uma amostra de cDNAs que contém transcritos específicos (expressão induzida), denominada de *tester* e a outra amostra de cDNAs de referência denominada *driver*. Os cDNAs (*tester* e *driver*) são hibridizados e as seqüências híbridas são, então, removidas. Conseqüentemente, os cDNAs não hibridizados remanescentes, representam genes que são expressos no *tester*, mas estão ausentes no *driver*. Para isolar genes expressos diferencialmente em MAs, foi efetuada a extração de RNA de raízes de 12 semanas micorrizadas e não-micorrizadas em condições de alto e baixo P. O cDNA foi sintetizado a partir do mRNA poliA(+) isolado da mistura de RNA total. A amostra composta foi preparada a partir dos RNAs totais isolados de cada uma das plantas que foram coletadas em cada tratamento. Portanto foi extraído RNA das cinco repetições de cada tratamento. As bibliotecas subtrativas foram construídas utilizando-se o “PCR select cDNA subtractive synthesis kit” (Clontech), conforme instruções do fabricante.

A biblioteca MS2 foi construída usando como “tester” o cDNA sintetizado a partir do mRNA isolado das raízes micorrizadas de 12 semanas cultivadas em condições de baixo P, portanto a biblioteca MS2 possui os cDNA que são mais abundantes nas raízes micorrizadas em baixo P. As amostras foram subtraídas das amostras de raízes não inoculadas em baixo P. A biblioteca MS3 foi construída usando como “tester” o cDNAs das raízes não-inoculadas de 12 semanas em condições de baixo P. Esta biblioteca possui cDNAs mais abundantes em raízes não inoculadas em condições de baixo P. Essas amostras foram subtraídas das amostras de raízes micorrizadas em baixo P. A biblioteca MS4 foi construída usando como “tester” o cDNA das raízes micorrizadas de 12 semanas em condições de alto P, a biblioteca MS4 possui cDNAs mais abundantes em raízes micorrizadas e alto P. As amostras foram subtraídas das amostras de raízes

não-inoculadas em alto P. A biblioteca MS5 foi construída usando como “tester” o cDNA das raízes não inoculadas de 12 semanas em condições de alto P, e os cDNAs seqüências obtidos são mais abundantes em raízes não-inoculadas em condições de alto P. As amostras foram subtraídas das amostras de raízes micorrizadas em alto P.

2.2.2.4.3 Clonagem dos fragmentos

Os cDNAs obtidos no passo anterior foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo pGEM-T-Easy foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30mM Tris-HCl pH7.8, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 5% polietileno glicol - PEG) e 3 U de T4 DNA ligase. Esse material foi incubado a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico utilizando-se a reação de ligação obtida. Após plaqueamento em meio Circle Grow (CG)-ágar contendo ampicilina (50 μ g/ml), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside) foram selecionadas colônias brancas contendo o plasmídeo recombinante. As bactérias contendo plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio CG líquido contendo ampicilina (50 μ g ml⁻¹ de meio).

As bibliotecas foram validadas pela quantificação de vetores recombinantes, através da digestão do DNA plasmidial de clones escolhidos aleatoriamente com a enzima de restrição *PvuII*. O plasmídeo pGEM-T- Easy Vector possui dois sítios de restrição com *PvuII* produzindo um fragmento de 2600 pb e outro de 340 pb. No fragmento de 340 pb está localizado o sítio de clonagem e portanto os fragmentos com tamanho superior a 340 pb possuem insertos.

2.2.2.4.4 Extração dos plasmídeos

Após o cultivo das bactérias durante toda a noite em meio CG líquido a 37°C, sob agitação. O meio foi centrifugado a 4.000 g por 5 minutos a 4°C. O pélete foi lavado com solução contendo 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0 e 50 mM glicose. Em seguida, foi adicionada uma

solução contendo 1% SDS e 0,2N NaOH, e incubou-se no gelo por 10 minutos. A essa solução foi adicionada uma solução contendo 3 M Acetato de Potássio e 10% ácido acético glacial, misturando por inversão. A solução foi incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para nova placa, adicionou-se 15 µg de RNase A, e incubou-se a 37°C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado, em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 4.000 g por 40 minutos a 4°C e lavou-se o pélete com etanol 70% gelado. O pélete foi então seco e o cDNA solubilizado em água ultrapura esterilizada. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm, e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% -TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probe), após varredura com densitômetro “FluorImager SI” (GE Healthcare).

2.2.2.4.5 Sequenciamento utilizando “DYEnamic ET Terminador”

Para o sequenciamento dos cDNAs utilizou-se uma alíquota de 200 - 500 ng de DNA plasmidial. Ao DNA plasmidial foi adicionado 10 pmol do iniciador M13F ou M13R, 2,0µl de “Dyenamic ET Terminator” (GE Healthcare), 2,0µl de solução tampão Save Money (200 mM Tris-HCL pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10µl. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C, e uma extensão final a 72°C, por 10 minutos em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os produtos da PCR foram precipitados com isopropanol 75% e incubados no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4.000g por 45 minutos a 4°C e lavou-se o pélete com etanol 70% a temperatura ambiente. O pélete foi então seco no escuro, ressuspendido em formamida e desnaturado a 96°C por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.2.2.4.6 Análises das bibliotecas

2.2.2.4.6.1 Análises das seqüências e anotação

Os cromatogramas gerados no seqüenciamento dos clones de cDNA foram inicialmente analisados pelo programa Phred/Phrap (Ewing & Green, 1998), para remoção do vetor contaminante e bases de baixa qualidade. Foram aceitas apenas as seqüências que apresentaram pelo menos 300 pb com qualidade >20. Este valor de qualidade representa 1 erro em cada 100 bases lidas. As seqüências com qualidade acima do mínimo estipulado foram agrupadas com o programa Cap3 (HUANG E MADAN, 1999). Para formar um *cluster*, as seqüências deviam apresentar no mínimo 30 bases de similaridade e 90% de identidade (-o 30 e -p 90). Adicionalmente foram calculados o Índice de Sucesso (eq. 1) e o Índice de Novidade (eq.2) de cada biblioteca.

$$IS = \frac{\text{total de seqüências com qualidade}}{\text{total seqüenciado}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 1})$$

$$IN = \frac{\text{número de clusters} + \text{número de singletons}}{\text{total de seqüências com qualidade}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 2})$$

As seqüências consenso dos clusters e as seqüências singletons foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, SUCEST e TIGR (E-Value <10⁻⁵ (ALTSCHUL et al, 1997). O número de acesso, e-value, função putativa, organismo, e a provável categoria do gene com a maior identidade foram anotadas.

2.2.2.4.7 Validação da biblioteca subtrativa supressiva MS2 (genes induzidos na micorriza em condições de baixo P)

2.2.2.4.7.1 Extração de RNA

As extrações de RNA das raízes de 4, 6, 8, 10 e 12 semanas em condições de alto e baixo P foram feitas segundo o protocolo descrito em **2.2.2.3**.

2.2.2.4.7.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 3 µg de RNA total, 50 ng de iniciadores Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎, 1 µl dNTP Mix 10 mM e H₂O DEPC, para volume final de 13 µL. O RNA foi desnaturado a 65°C por 5 min e resfriado em gelo por 1 min. Foi adicionado 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 1 µl de DTT 0,1 M 1 µl de RNaseOUT 1 µl de transcriptase reversa Superscript III (200 U/µl). As amostras foram incubadas por 60 min a 50°C. A transcriptase reversa foi inativada a 70°C por 15 min. Foram adicionadas 2 U de RNaseH às reações, e incubou-se por 20 min a 37°C, para a degradação das fitas de RNA dos híbridos de cDNA:RNA formados. As soluções de cDNA foram armazenadas a -20°C.

2.2.2.4.7.3 Desenho dos primers para confirmação da expressão gênica diferencial

O programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) foram utilizados para o desenho e verificação da estabilidade dos primers utilizados na análise de expressão dos transcritos por qRT-PCR para a validação dos macroarranjos. Os pares de primers estão detalhados no Apêndice A.

2.2.2.4.7.4 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

As amplificações quantitativas em tempo real das amostras de cDNA (RT-qPCR) foram conduzidas para reações com volume de 10 µl, contendo 1 µl da diluição de cDNA 1:20 (v/v), 0,32 µM do cada iniciador específico (Apêndice A) e 5 µl Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG 2X (Invitrogen). As amplificações foram realizadas no termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Austrália) em triplicatas, com incubação inicial de 50° C por 2 minutos, 95° C por 5 minutos, 45 ciclos de 95° C 30 por segundos, 58° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos, com a detecção da fluorescência no final da extensão de cada ciclo e com uma extensão

final a 72° C por 1 minuto e 30 segundos. Com o término da reação, a curva de dissociação do DNA para cada produto amplificado foi determinada entre 72° C e 99° C. Os experimentos incluíram um controle negativo (reação sem cDNA), e a eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinada através de curva padrão de diluição serial do cDNA (1:20, 1:400, 1:8000). A aquisição dos dados foi feita através do programa Rotor Gene Real-Time Analysis 1.7.65 (Corbett), o qual calcula os valores de cycle threshold (Ct) e a eficiência da reação de PCR (E). A média dos Ct das triplicatas foi usada para determinar as diferenças na expressão utilizando-se como controle constitutivo um gene codificando actina baseado na equação de expressão relativa $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$. O método $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ é utilizado para analisar mudanças relativas na expressão do gene de interesse usando como calibrador o tratamento não-inoculado e um gene controle ($\Delta C_t = C_t$ (gene interesse) – C_t (gene controle) e $\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t$ (raízes inoculadas) - ΔC_t (raízes não-inoculadas)). Usando o método $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, os dados são apresentados como número de vezes que o gene de interesse foi expresso em relação a um gene controle (dado normalizado) e esse valor é calculado em relação ao controle sem inocular (calibrador). Para os controles sem inocular o valor $\Delta\Delta C_t$ é igual a zero e 2^0 é igual a um, por isso, por definição, a expressão realtiva do gene nos tratamentos sem inocular é igual a 1. Para as amostras inoculadas a avaliação do valor $\Delta\Delta C_t$ significa o número de vezes que o gene foi expresso em relação ao controle sem inocular (Livak; Schmittgen, 2001). Já que os experimentos não contem repetição biológica, diferenças significativas na expressão foram estimadas baseadas no valor 2,8 proposto por Benitez et al. (2005), enquanto diferenças relativas entre 0,36 e 2,8 foram consideradas não significativas.

2.2.2.5. Análise de expressão gênica por hibridização em macroarranjos de cDNA

2.2.2.5.1. Preparação das membranas de alta densidade

Os macroarranjos de cDNAs com expressão diferencial putativa em MAs foram construídos por D. Takahashi (2005) no laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ-USP). Para montar os arranjos foram selecionadas 384 ESTs com expressão diferencial putativa de 4 bibliotecas de cDNA, construídas com RNA extraído de raízes de 8 semanas em condições de alto e baixo P, e uma biblioteca subtrativa. Estes clones foram arranjados em microplacas (96 poços) em duplicatas, totalizando oito placas. Uma placa adicional foi arranjada com três genes controle:

actina (SCESMY3008F10), fator de alongamento 1α (SCESMY4002D07) e β -tubulina (SCESMY1003C03). Os insertos selecionados foram amplificados por PCR em solução contendo: tampão para reação PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de $MgCl_2$, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas), 10 ng de DNA, 5 pmol de iniciadores universais M13F e M13R e água desionizada esterilizada, para um volume final de 40 μ L. A reação foi feita nas seguintes condições: 95°C por 2 min, e 30 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. Os produtos de amplificação foram quantificados por comparação com padrão de massa DNA low mass leader (Invitrogen) após eletroforese em gel de agarose 1,0% - TBE 0,5X, comparados com o padrão de massa “DNA low mass ladder” (Invitrogen) e purificado por precipitação com 1/10 de volume de 3 M de acetato de sódio (pH 5,5), 2 volumes de etanol 100%, e centrifugados a 4.000 g por 45 min a 4°C. O pélete foi lavado com 200 μ L de etanol 70% e seco durante uma hora a temperatura ambiente. O cDNA foi solubilizado em água desionizada esterilizada para uma concentração final de 50 ng DNA μ L⁻¹, e armazenado a -20°C até o momento da transferência para as membranas. Para a impressão das membranas foram adicionados aos produtos amplificados uma solução de 0,4 N de NaOH para uma concentração final de 25 ng DNA μ L⁻¹ e 0,2 N de NaOH. O DNA foi então desnaturado por 15 min a 37°C e transferido para membranas Hybond-N (GE Healthcare) com um carimbo manual composto por 96 agulhas (V&P Scientific). Este carimbo deposita 0,1 μ L de solução na membrana, correspondendo a aproximadamente 2,5 ng de DNA. A impressão foi repetida 4 vezes para se atingir a quantidade de 10 ng de DNA por *spot*. O conjunto de nove microplacas foi impresso em uma membrana de 80x115mm, com uma configuração 3x3 (864 pontos). O DNA foi fixado nas membranas por UV em cross-linker Stratalinker 2400 (Stratagene) por aproximadamente 1 min a 70 mJ s⁻¹. As membranas foram então armazenadas à temperatura ambiente entre folhas de papel de filtro até o momento do uso.

2.2.2.5.2 Preparação da sonda e hibridização dos macroarranjos

As sondas foram sintetizadas como descrito por Nogueira et al (2003). Os macroarranjos foram hibridizados com cDNA solubilizado a partir de RNA total extraído das raízes de cana-de-açúcar colonizadas com *G. clarum* 4, 8 e 12 semanas após a inoculação em condições de baixo P.

Portanto, 30 µg de RNA total foram submetidos à transcrição reversa com Superscript III (Invitrogen) usando o iniciador oligo-dT18 (3 uM), dCTP marcado com ^{33}P com atividade de 3000 Ci mmol $^{-1}$ e dATP, dGTP e dTTP não marcados por 20 min a 42 °C. Após este período, foi adicionado dCTP não marcado na concentração final de 1 mM, e a reação prosseguiu por mais 1 hora a 42 °C. As sondas de cDNA foram purificadas utilizando-se microcolunas Probe-Quant G-50, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). As membranas foram pré-hibridizadas por duas horas em uma solução de pré-hibridização (5X SSC, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 50% de formamida deionizada, 10 X Solução de Denhardt's, 1% de SDS e 1 mg de DNA de esperma de salmão).

A solução de pré-hibridização foi descartada e adicionou-se às membranas a solução de hibridização (5X SSC, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50% de formamida desionizada, 2X Solução de Denhardt's, 1% de SDS, 5% de Dextran e 1mg de DNA de esperma de salmão) juntamente com a sonda purificada e desnaturada a 94° por 10 min. A hibridização foi feita por 18h a 42°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas sequencialmente com as seguintes soluções: 0,2X SSC com 0,5% SDS por 20 min a 58°C (2 vezes), 0,5 X SSC com 0,5% SDS por 20 min a 58 °C (2 vezes) e 0,2 X SSC com 0,5% SDS o 20 min a 58°C (2 vezes). Em seguida as membranas foram utilizadas para sensibilizar filmes IP (GE Healthcare) por 96 h. O sinal de hibridização foi detectado através de varredura, utilizando-se um densitômetro laser STORM (GE Healthcare).

2.2.2.5.3 Análise dos Resultados

2.2.2.5.3.1 Normalização dos dados de hibridização em macroarranjos de cDNA

A intensidade do sinal de hibridização de cada *spot* na membrana foi determinado usando o programa ArrayVision (GE Healthcare) (SHI et al, 2005; QING-CHAO et al, 2007). A normalização dos dados, ou seja, o ajustamento sistemático das diferenças na intensidade relativa de cada *spot*, que não representam diferenças reais, foi feita através dos dados de intensidade de sinal corrigidos para *background* e ajustados para a quantidade de DNA em cada *spot*, utilizando-se a média do valor de intensidade obtida para os genes controle actina (SCESMY3008F10) e β -tubulina (SCESMY1003C03). Após a normalização, os dados foram transformados usando log $_2$. A análise gráfica foi feita para cada membrana verificando-se os valores discrepantes entre e dentro

das repetições. Os valores de intensidade de sinal discrepantes foram descartados (WOLFINGER et al, 2001).

2.2.2.5.3.2 Modelo estatístico

Os dados gerados no experimento de macroarranjo foram analisados usando o modelo misto (WOLFINGER et al, 2001) em dois estágios:

Em um **primeiro estágio** foi ajustado o modelo de normalização dos dados, conforme equação (1):

$$y_{ilklm} = \mu + G_i + T_j + M_k + Q_{(k)l} + r_{ijklm} \quad (1)$$

Onde y_{ilkl} é o logaritmo na base dois da intensidade de sinal (expressão gênica); μ é uma constante associada a cada observação; G_i é o efeito do gene i ($i = 1, \dots, 384$); T_j é o efeito do tratamento j ($j = 1, 2$); M_k é o efeito aleatório da membrana k ($k = 1, \dots, 8$); $Q_{(k)l}$ é o efeito do quadrante l ($l = 1, \dots, 96$) dentro da membrana k , r_{ijklm} é o erro aleatório associado a cada observação. O efeito $Q_{(k)l}$ foi incluso para permitir o ajuste para efeito espacial na membrana. Neste modelo assume-se que M_k , $Q_{(k)l}$ e r_{ijklm} possuem todos distribuição normal aleatória $N(0, \sigma_k^2)$, $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_r^2)$ e são independentes um do outro.

Em um **segundo estágio** um modelo de efeitos gene-específico foi ajustado a partir dos resíduos obtidos pelo ajuste do modelo de normalização, conforme equação (2):

$$r_{gijk} = G_g + T_{(g)i} + M_{(gi)j} + e_{gijk} \quad (2)$$

Onde r_{gijkl} é o resíduo do modelo de normalização; G_g é o efeito médio do gene g ; $T_{(g)i}$ é o efeito do tratamento i dentro do gene g ; $M_{(gi)j}$ é o efeito da membrana j dentro do tratamento i e gene g e, e_{gijk} erro aleatório associado a cada observação. Neste modelo assume-se que os efeitos M_k e e_{ijklm} possuem todos distribuição normal aleatória $N(0, \sigma_Q^2)$, $N(0, \sigma_e^2)$ e são independentes um do outro.

2.2.2.5.3.3 Análises de bioinformática

As seqüências de nucleotídeos de todos os “clusters” usados nas membranas de macroarranjos foram comparadas com seqüências em bancos de dados do NCBI, TIGR, TAIR e SUCEST, utilizando-se o programa TBLASTX. O número de acesso, o e-value, a função putativa, o organismo, e a provável categoria do gene com a maior identidade foram anotadas.

2.2.2.5.4 Validação dos resultados de hibridização em macroarranjos de cDNA por RT-qPCR

2.2.2.5.4.1 Extração de RNA

O RNA das raízes de cana-de-açúcar de 4, 6, 8, 10 e 12 semanas inoculadas e não-inoculadas em condições de baixo P, foi extraído conforme descrito em **2.2.2.3**.

2.2.2.5.4.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita conforme descrito em **2.2.2.4.7.2**

2.2.2.5.4.3 Primers usados para confirmar a análise da expressão gênica dos macroarranjos

O desenho dos primers para a análise de expressão gênica dos macroarranjos foi feita segundo o protocolo descrito em **2.2.2.4.7.3**. Os pares de primers utilizados estão detalhados no Apêndice B.

2.2.2.5.4.4 Análise da expressão gênica dos macroarranjos de cDNA mediante PCR quantitativo

As amplificações quantitativas em tempo real das amostras de cDNA (RT-qPCR) foram conduzidas conforme descrito em **2.2.2.4.7.4** utilizando como controle um gene codificando actina (TC48151).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Biomassa vegetal parte aérea

A inoculação com *G. clarum* não afetou significativamente a produção de biomassa de cana-de-açúcar utilizada neste experimento (teste Tukey, $p < 0,05$). Também não foram observadas diferenças significativas entre a massa da matéria seca da parte aérea das plantas adubadas com 200 mg de P (alto P) e aquelas adubadas com 20 mg de P (baixo P) (teste Tukey, $p < 0,05$) (Figura 1).

Figura 1 - Biomassa vegetal da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) 4, 6, 8, 10 e 12 SAI em vasos contendo 20 (PB) ou 200 mg P kg⁻¹ de substrato (PA). Os dados representam as médias de cinco repetições $\pm$ desvio padrão da média

Esses resultados sugerem que se ocorrem diferenças na expressão gênica em MAs sob diferentes condições de P, essas não estariam associadas a um possível efeito nutricional. A associação com FMAs não possui especificidade, mas tem se demonstrado que a resposta à micorrização depende tanto da espécie de fungo como de plantas envolvidas no processo (SIQUEIRA; KLAUBERG-FILHO, 2000).

Estudos feitos em nosso laboratório mostraram que o fungo *G. clarum* promove o crescimento da cana-de-açúcar, mas não tem efeito nutricional (TAKAHASHI, 2005).

2.3.2 Colonização micorrízica

Os resultados de porcentagem de colonização micorrízica são apresentados na Figura 2.

Em condições de baixo P houve aumento na porcentagem de colonização ao longo do tempo de desenvolvimento sendo que a porcentagem de colonização com 12 SAI foi 6 vezes maior do que com 4 SAI. Nas raízes inoculadas com *G. clarum* com 4, 6, 8, 10 e 12 SAI a porcentagem de colonização micorrízica foi 10; 3,1; 3,2; 3,2 e 3,9 vezes maior na condição de baixo P; quando comparada com à condição de alto P, respectivamente.

Figura 2 - Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *Glomus clarum* e cultivadas com 20 (PB) ou 200 (PA) mg P kg⁻¹ de substrato. As plantas foram colhidas 4, 6, 8, 10 e 12 SAI. Os dados são médias de 5 repetições. As barras representam o desvio padrão da média

O P é o mais importante nutriente inorgânico que afeta o desenvolvimento de MAs, controlando principalmente a taxa de crescimento fúngico intrarradicular (SIQUEIRA, 1983; GRAHAM et al., 1981). Normalmente, altas concentrações de P na planta inibem a colonização das raízes, enquanto que baixas concentrações favorecem a colonização intrarradicular. Várias hipóteses já foram propostas para explicar a regulação do desenvolvimento de MAs por P. O P pode afetar a exsudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição do fungo e/ou sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização. Evidências

que suportam esta hipótese foram apresentadas por Graham et al. (1981), os quais demonstraram em condições de alta concentração de P que a permeabilidade da membrana e a exsudação radicular diminuem. Siqueira (1983), por outro lado, propôs que, em altas concentrações de P, a concentração de sacarose translocada via floema até as raízes aumenta, inibindo o crescimento fúngico. Lambais e Medhy (1993) sugeriram que a concentração de P na planta afeta a expressão de genes envolvidos na defesa vegetal, os quais poderiam regular o crescimento fúngico intrarradicular. Lambais e Mehdy (1993) sugeriram também que a modulação da expressão de genes de defesa pelo P pode envolver alterações no balanço de fitohormônios (FHs) nos tecidos vegetais. De uma maneira geral, os FMAs poderiam causar alterações no balanço de fitohormônios nas raízes, alterando a expressão de genes de defesa vegetal ou genes simbiose-específicos e regulando o desenvolvimento da simbiose.

2.3.3 Identificação de genes com expressão diferencial em MAs através de hibridização subtrativa supressiva

Das quatro bibliotecas subtrativas supressivas obtidas, foram seqüenciados 952 clones, sendo 256 clones da biblioteca MS2 possui (cDNA que são mais abundantes nas raízes micorrizadas em baixo P), 224 da biblioteca MS3 (cDNA que são mais abundantes nas raízes não-inoculadas em baixo P), 272 da biblioteca MS4 (cDNA que são mais abundantes nas raízes micorrizadas em alto P) e 200 clones da biblioteca MS5 (cDNA que são mais abundantes nas raízes não inoculadas em alto P). Desses clones 196 da biblioteca MS2, 176 da MS3, 121 da biblioteca MS4 e 178 clones da biblioteca MS5 apresentaram a qualidade necessária para as análises posteriores. A tabela 1 apresenta os agrupamentos de seqüências (clusters) feitos com o programa CAP3, as seqüências que não formaram clusters (singletons), e os Índices de Novidade e Sucesso de cada uma das bibliotecas.

Tabela 1 - Características das bibliotecas subtrativas supressivas construídas

Nome da biblioteca	Reads válidos	Total de singletons	Reads em contigs	Total de contigs	Total de clusters	Índice de Sucesso(%)	Índice de Novidade(%)
MS2	196	41	155	33	74	78	37,76
MS3	176	23	153	15	38	71	21,59
MS4	121	12	109	10	22	57	18,18
MS5	178	24	154	19	43	88	24,16

As quatro bibliotecas apresentaram índices médios de novidades e de sucesos de 25,42 e 73,5, respectivamente. Para a biblioteca MS2 o índice de novidade foi de aproximadamente 38%, o que significa que de cada 10 sequências obtidas aproximadamente 4 sequências são novas no banco de dados. Para as bibliotecas MS3, MS4 e MS5, o índice de novidade sugere que de cada 10 sequências obtidas 2 são novas no banco de dados. Esses dados sugerem que a maioria dos genes novos possivelmente envolvidos na regulação da simbiose serão aqueles induzidos em MAs em condições de baixo P; em relação as demais condições avaliadas.

2.3.4 Classificação das ESTs

Os clusters de ESTs e singletons identificados nas quatro bibliotecas subtrativas supressivas foram classificados de acordo com sua função biológica nas categorias descritas pelo SUCEST (Tabela2).

Tabela 2 - Descrição das categorias do SUCEST

Categorias	Descrição
SC1	Metabolismo de aminoácido
SC2	Bioenergética
SC3	Comunicação celular/Transdução de sinais
SC4	Dinâmica celular
SC5	Metabolismo de DNA
SC6	Metabolismo de lipídeos ácidos graxos e isoprenóides
SC7	Elementos genéticos móveis
SC8	Metabolismo de nucleotídeos
SC9	Metabolismo de N, P e S
SC10	Crescimento vegetal e desenvolvimento
SC11	Metabolismo de proteínas
SC12	Metabolismo de RNA e transcrição
SC13	Metabolismo secundário
SC15	Resposta ao estresses
SC16	Transporte
SC17	Proteína putativa
SC18	Não Definida (ND)
SC19	Similaridade não significativa nos bancos de dados

As categorias SC2, SC3, SC4, SC11, SC16, SC17, SC18 e SC19 estiveram representadas nas quatro bibliotecas. Genes com expressão diferencial putativa da categoria SC1 só foram detectados nas bibliotecas MS3 e MS5, enquanto genes com expressão diferencial putativa da categoria SC10 só foram detectados nas bibliotecas MS2, MS4 e MS5. Genes com expressão diferencial putativa da categoria SC12 foram detectados nas bibliotecas MS2 e MS5, genes com expressão diferencial putativa da categoria SC13 só foram detectados nas bibliotecas MS2, MS3, MS4, e genes com expressão diferencial putativa da categoria MS15 foram detectados nas bibliotecas MS2, MS3, MS5.

Na biblioteca MS2, as categorias SC4 (18%), SC11 (23%) e SC15 (14%) foram as mais representativas. Na biblioteca MS3, os genes encontrados se distribuíram em maior proporção entre as categorias SC4 (16%), SC11 (13%), SC15 (16%), SC16 (10%) e SC18 (11%). Em MS4, as categorias mais representativas foram SC2 (23%) e SC11 (32%). Finalmente na biblioteca MS5, as categorias que tiveram uma maior quantidade de genes com expressão diferencial putativa foram SC3 (14%), SC10 (12%), SC15 (12%), SC16 (16%) e SC17 (14%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de clusters de ESTs com expressão diferencial putativa por categorias em cada uma das bibliotecas subtrativas supressivas construídas

Categoria	% de clusters			
	MS2	MS3	MS4	MS5
SC1	ND	5	ND	5
SC2	8	8	23	9
SC3	6	3	4	14
SC4	18	16	4	5
SC5	ND	ND	ND	ND
SC6	ND	ND	ND	ND
SC7	ND	ND	ND	ND
SC8	ND	ND	ND	ND
SC9	ND	ND	ND	ND
SC10	1	ND	4	12
SC11	23	13	32	2
SC12	1	ND	ND	2
SC13	5	5	5	ND
SC14	ND	ND	ND	ND
SC15	14	16	ND	12
SC16	8	10	5	16
SC17	5	8	9	14
SC18	8	11	9	2
SC19	3	5	5	7

ND = não detectado

2.3.5 Identificação de genes com expressão diferencial por hibridização subtrativa supressiva

Na biblioteca MS2 foi identificado o transcrito diferencialmente expresso do gene SCESMS2001C02 (cysteine protease component of protease-inhibitor complex) de cana-de-açúcar. As cisteinas proteases participam no metabolismo de degradação de proteínas durante o desenvolvimento das plantas e foram descritas também como sendo induzidas em MAs (TAKEDA et al, 2007).

Em *L. japonicus* uma cisteína protease foi induzida tanto em raízes micorrizadas como noduladas, 8 dias após a inoculação (KISTNER et al., 2005). Já, em *M. truncatula* foi expressa em nódulos e raízes micorrizadas senescentes, sugerindo que os processos celulares associados à senescência do arbúsculo e dos nódulos sejam comum as duas simbioses (LIU et al., 2003). Em nosso estudo, a análise por PCR quantitativo mostrou um aumento de 77 vezes no acúmulo de transcritos do gene SCESMS2001C02 (cisteína protease component of protease-inhibitor

complex) em MAs em condições de baixo P, em relação ao controle não-inoculado 12 SAI (Tabela 8). Esse resultado sugere que os altos níveis de transcritos desse gene nos estádios tardios do desenvolvimento de MAs está associado com o grau de colonização pelo FMA. Sabe-se que MAs induzem o acúmulo de transcritos em raízes de *L. japonicus*, *M. truncatula* e *O. sativa* (LIU et al., 2003; Guimil et al., 2005; Kistner et al., 2005). Liu et al, 2005 demonstraram que um gene similar à uma cisteína protease foi induzido 8 dias após a inoculação com FMAs e em raízes noduladas de *L. japonicus*. Análises de fragmentos de cDNA codificando essa proteína mostraram que em *L. japonicus* as mesmas são codificadas por uma família multigênica e que o comportamento de cada uma das isoformas no estabelecimento da simbiose está longe de ser elucidada (Kistner et al., 2005)

O gene SCESMS2001F05 homólogo a uma remorina (pp34) foi outro dos genes encontrados na biblioteca MS2 pertence à categoria de dinâmica celular (SC4), com expressão diferencial putativa. O gene codificando remorina foi isolado e clonado da membrana plasmática de batata (REYMOND et al., 1996). Devido à sua atividade de quinase de proteínas está envolvida na percepção, transdução do sinal e ativação da resposta de defesa em tabaco (ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al., 2000). Em interações patogênicas foi proposto que a remorina atuaria em uma interface formada entre a planta e o patógeno. Essa interface tem um papel muito importante para o estabelecimento da interação planta-patogeno (MATHIEU et al., 1991). A indução do gene da remorina em raízes de *L. japonicus* micorrizadas com *G. intraradices* foi retardada em relação a outros genes induzidos na micorrização (KISTNER et al., 2005). Os níveis de transcritos da remorina permaneceram próximos do nível basal 7 ou 8 dias após da inoculação, mas o acúmulo de transcrito aumentou consideravelmente 12 ou 14 dias após da inoculação (KISTNER et al., 2005). Em nosso experimento por PCR quantitativo, o gene da remorina foi induzido aproximadamente 6,3 vezes na semana 8 SAI e essa indução foi mantida no mesmo nível até 12 SAI. Com 6 SAI, o acúmulo de transcritos do gene SCESMS2001F05 (Remorina pp34) foi 100 vezes maior no tratamento não-inoculado do que no inoculado, portanto o nível de transcritos desse gene nas amostras de raízes de 6 SAI pode ser considerado abaixo do limite de detecção da metodologia adotada (Tabela 8).

O gene SCESMS2001B08 identificado na biblioteca MS2 codifica uma proteína homóloga a dehidroascorbate redutase a qual participa na resposta ao estresse oxidativo (YOUNG-PYO et al.,

2007). A função dessa enzima é a de reduzir o dehidroascorbato a ascorbato, usando a glutathione (GSH) como doador de elétrons. É uma enzima crítica para manter o nível apropriado de ascorbato nas células. A expressão desse gene em plantas micorrizadas observadas em nosso experimento está em concordância com outras pesquisas que mostraram a regulação diferencial de várias enzimas do estresse oxidativo em MAs (LAMBAIS et al., 2003; SKAMNIOTI et al., 2007; BLILOU et al. 2000a). Nas quantificações de transcritos realizadas por qRT-PCR em nosso experimento pode-se observar que o gene SCESMS2001B08 (dehidroascorbate redutase) apresentou acúmulo de transcritos diferencial ao longo do tempo após a inoculação. Esse gene foi 4,54 vezes suprimido 4 SAI, 100 vezes 6 SAI, 7,7 vezes 8 SAI e 100 vezes 10 SAI. Já com 12 SAI, o acúmulo de transcritos desse gene foi induzido 5,44 vezes (Tabela 8). Esses resultados sugerem um envolvimento tardio do gene SCESMS2001B08 (dehidroascorbate redutase) na MA.

O gene SCESMS2001C11 codifica uma proteína homóloga ao precursor da glicoproteína rica em hidroxiprolina DZ-HRGP; pertence à categoria de resposta ao estresse (SC15). Esse gene está envolvido nas respostas de defesa vegetal e associado ao reforço da parede celular (RINGLI et al., 2005). Estudos que analisaram a expressão diferencial de genes codificando HRGPs em raízes micorrizadas mostraram um aumento na quantidade de mRNA codificando HRGPs em raízes de milho e feijão nas células contendo arbúsculos (HARRISON, 1999; BALESTRINI et al., 1997). O gene codificando uma HRGP, avaliado neste estudo mostrou que o acúmulo de transcritos foi suprimido em 4 e 6 SAI e induzido em 10 e 12 SAI. Em raízes inoculadas com 4 SAI, esse gene foi suprimido 7,14 vezes e com 6 SAI a supressão foi de 10 vezes, em relação ao controle não-inoculado. Em raízes inoculadas com 10 SAI, esse gene foi induzido 13,94 vezes e com 12 SAI 8,87 vezes em relação ao controle não inoculado (Tabela 8). Esses resultados sugerem um aumento da expressão desse gene com o aumento do grau de colonização das raízes pelo FMA.

O gene SCESMS2003C08 codificando uma proteína homóloga a horcolina também foi induzido na MA em cana-de-açúcar. Horcolina é similar à lectina isolada de coleóptilos de cevada (*Hordeum vulgare*) (GRUNWALD et al., 2007). Esta proteína está localizada na parede celular e homólogos dela foram achados em tratamentos aplicando luz (POTTER et al. 1996) e metil jasmonate (MENHAJ et al. 1999) no coleóptilo. Horcolina tem especificidade por manose, e os estudos de caracterização mostraram que pertence à família das jacalinas. Análises do acúmulo de

transcritos desse gene através do tempo mediante qRT-PCR mostraram uma supressão de 3,03 vezes em raízes com 4 SAI, e de 20 vezes em raízes com 6 SAI já com 8 e 12 SAI houve uma indução de 10,59 e 7,51 vezes no acúmulo de transcritos, respectivamente em relação a raízes não-inoculadas (Tabela 8).

Transcritos diferencialmente expressos de SCESMS2003A03 codificando uma proteína associada à senescência foram encontrados em MS2. Estas proteínas são importantes no desenvolvimento das MAs pois poderiam estar envolvidas no processo de senescência dos arbúsculos. Em nosso experimento foi avaliado o comportamento desse gene ao longo do desenvolvimento da MA e foi possível observar uma supressão de 6,25 vezes com 4 SAI, seguida de uma indução de 27,42 vezes 6 SAI e de 5,33 vezes 10 SAI (Tabela 8).

Na biblioteca MS2 foi detectado também o gene SCESMS2001E09 codificando uma proteína homóloga ao receptor quinase SHR5 descrito por Vinagre et al. (2006). Esse receptor quinase está envolvido na associação simbiótica de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio com cana-de-açúcar. O acúmulo de transcritos, do gene SCESMS2001E09 foi suprimido em cana-de-açúcar associada exclusivamente com bactérias endofíticas benéficas (VINAGRE et al., 2006). O acúmulo de transcritos do gene codificando o receptor quinase SHR5 é ainda mais suprimido quando é aplicada na cana-de-açúcar uma mistura de bactérias endofíticas contendo *Herbaspirillum spp*, *Azospirillum brasilensis* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mas o nível de expressão depende do genótipo de cana-de-açúcar (VINAGRE et al., 2006). A presença desse gene na biblioteca MS2 sugere que o mesmo é induzido também durante o estabelecimento das MAs. No entanto, não foi possível fazer sua quantificação por qRT-PCR, provavelmente devido à baixa abundância de transcritos.

Outro gene que poderia ser de interesse para o desenvolvimento das MAs é o SCESMS2001G05, o qual codifica uma protease semelhante à legumina. Essas proteínas têm sido implicadas na morte celular programada (MCP). No entanto, não foi possível amplificar esse gene por PCR quantitativo nos diferentes tempos avaliados, sugerindo baixa abundância de transcritos.

Outro gene com acúmulo diferencial de transcritos em rapizes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* é o SCESMS2001C03 o qual codifica uma proproteína convertase. As proproteínas convertases estão envolvidas na ativação de uma grande variedade de substratos,

dentre eles hormônios peptídicos, receptores e enzimas. Segundo a classificação do SUCEST as proproteínas convertases estariam relacionadas com a bioenergética da célula, mas também podem estar associadas à resposta de defesa (Jorda et al., 1999). Proproteínas convertases semelhantes a proteases de subtilisina são induzidas em tomateiros após infecção por patógeno e pela aplicação de ácido salicílico (Jorda et al., 1999). A confirmação da expressão diferencial desse gene em MAs, deverá, no entanto, ser realizada por qRT-PCR.

Tabela 4 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS2001B12.g	Enolase 1 (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64665	5 e-69
SCESMS2001C03.g	proprotein convertase aPC6C isoform	SC2	<i>B. californiense</i>	AF184617	4 e-07
SCESMS2001D04.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>Z. mays</i>	X07156	7 e-56
SCESMS2001H05.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64682	2.7 e-51
SCESMS2002G08.g	enolase 2 (2-phosphoglycerate dehydratase 2), complete	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64747	9.1 e-45
SCESMS2001F01.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64685	1.5 e-68
SCESMS2001B07.g	GTP-binding nuclear protein RAN-B1	SC3	<i>O. sativa</i>	TC335268	8.2 e-39
SCESMS2001D09.g	catalytic/ serine carboxypeptidase	SC3	<i>Z. mays</i>	TC372315	7.7 e-17
SCESMS2002F10.g	S-adenosylmethionine synthetase	SC3	<i>O. sativa</i>	AP002482	3 e-63
SCESMS2002E05.g	serine/threonine protein kinase-like	SC3	<i>Z. mays</i>	TC372504	7.1 e-47
SCESMS2001E07.g	actin ITL-1	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC48288	2.6 e-51
SCESMS2001F05.g	Remorin (pp34)	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC64666	6.7 e-60
SCESMS2002F12.g	alpha tubulin chain (fragment)	SC4	<i>Z. mays</i>	TC367492	9.0 e-56
SCESMS2002H05.g	putative histone H2A	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC57189	3.0 e-31

Tabela 4 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

(continua)					
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS2002H06.g	unknown protein	SC4	<i>Z. mays</i>	AF201459	1 e-46
SCESMS2002E04.g	putative histone H2A protein	SC4	<i>Z. mays</i>	TC326433	5.4 e-33
SCESMS2001A05.g	putative actin	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC48401	2.5 e-34
SCESMS2001D08.g	histone H3.2 protein	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC64833	2.6 e-45
SCESMS2001C04.g	putative glycine-rich protein	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC49226	1.0 e-35
SCESMS2001A02.g	Histone H3 variant H3.3	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC64840	1.9 e-60
SCESMS2001F10.g	alpha tubulin chain	SC4	<i>Z. mays</i>	X15704	9 e-54
SCESMS2002C06.g	Nucleoside diphosphate kinase	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC66611	1.1 e-54
SCESMS2001A12.g	endo-1,4-beta-gluS. Officinarumse Cell	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC57326	2.0 e-88
SCESMS2001C10.g	caffeic acid 3-O-methyltransferase	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC64952	1.5 e-33
SCESMS2001D05.g	Probable ubiquitin-fold modifier 1 precursor	SC11	<i>Z. mays</i>	TC352528	7.5 e-24
SCESMS2001E06.g	ribosomal protein RL5	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC47964	3.0 e-83
SCESMS2001E10.g	heat shock protein 82	SC11	<i>O. sativa</i>	OSHSP82A	2 e-34
SCESMS2001H07.g	glutamine-rich protein	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65873	5.9 e-62
SCESMS2002A08.g	DNA-binding protein MNB1B (HMG1-like protein)	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC64791	2.8 e-17
SCESMS2002A12.g	putative cytoplasmic ribosomal protein S15a	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC57536	6.5 e-48
SCESMS2002C12.g	maize 20S proteasome alpha subunit	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65810	3.1 e-56
SCESMS2003C03.g	ubiquitin conjugating enzyme	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC49336	4.5 e-73
SCESMS2003C07.g	putative ribosomal protein S19	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65187	2.9 e-70
SCESMS2001B05.g	cysteine protease component of protease-inhibitor complex	SC11	<i>Z. mays</i>	AB020961	7 e-22
SCESMS2001C02.g	cysteine protease component of protease-inhibitor complex	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC48758	2.2 e-43

Tabela 4 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

(continua)					
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS2002E10.g	Elongation factor 1-gamma	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65027	8.4 e-78
SCESMS2001B02.g	translation initiation factor	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC64688	3.4 e-37
SCESMS2001A03.g	acidic ribosomal protein P2a-4	SC11	<i>Z. mays</i>	ZMU62748	2 e-19
SCESMS2001H11.g	putative ubiquitin-specific protease 6	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC57729	7.7 e-86
SCESMS2001B10.g	putative ubiquitin-conjugating enzyme E2	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC48751	2.5 e-34
SCESMS2001F03.g	ribosomal protein L17	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC49327	2.8 e-82
SCESMS2001F12.g	Ocs-element binding	SC12	<i>S. officinarum</i>	TC65239	1.0 e-21
SCESMS2001A08.g	putative glucosyltransferase	SC13	<i>O. sativa</i>	AP002524	4 e-33
SCESMS2001E09.g	SHR5-receptor-like kinase	SC13	<i>S. officinarum</i>	DQ067098	4 e-20
SCESMS2001A06.g	nknown protein	SC13	<i>S. officinarum</i>	TC57158	7.9 e-63
SCESMS2001A07.g	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	SC13	<i>S. officinarum</i>	TC56419	7.1 e-68
SCESMS2001B08.g	dehydroascorbate reductase	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC57354	9.1 e-73
SCESMS2001C11.g	Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP precursor	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC65495	9.6 e-25
SCESMS2001D03.g	putative polyubiquitin	SC15	<i>T. aestivum</i>	TC234276	1.2 e-36
SCESMS2002B06.g	selenoprotein-like	SC15	<i>O. sativa</i>	BAB90212	2 e-40
SCESMS2002B07.g	Salt tolerance protein 2	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC65180	8.6 e-49
SCESMS2003C06.g	metallothionein-like protein type I	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC48218	3.2 e-34
SCESMS2003F07.g	metallothionein-like protein type I	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC47985	3.6 e-39
SCESMS2001F04.g	aspartic proteinase oryzasin 1 precursor	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC56921	5.6 e-65
SCESMS2001C06.g	drought-induced protein – like	SC15	<i>A. thaliana</i>	X78584	4 e-55
SCESMS2001C07.g	hypothetical protein wali7	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC56763	4.0 e-69
SCESMS2002B12.g	putative CorA-like Mg ²⁺ transporter protein	SC16	<i>O. sativa</i>	AAR87307	2 e-40
SCESMS2002E11.g	putative ABC transporter	SC16	<i>O. sativa</i>	TC326126	4.0 e-54

Tabela 4 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

					(conclusão)
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS2001C12.g	PDR-like ABC transporter	SC16	<i>O. sativa</i>	TC326126	2.0 e-29
SCESMS2001A09.g	ADP,ATP carrier-like protein	SC16	<i>Z. mays</i>	TC361986	2.3 e-74
SCESMS2001A04.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC47985	1.0 e-25
SCESMS2001D11.g	putative steroid-binding protein	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC65641	1.1 e-37
SCESMS2003A04.g	ADP ribosylation GTPase-like protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC59091	2.7 e-51
SCESMS2003G03.g	ADP ribosylation GTPase-like protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC59091	4.0e-67
SCESMS2003H08.g	putative SLT1 protein (ion homeostasis related protein) sodium/lithium tolerance protein	SC17	<i>O. sativa</i>	AY672599	2 e-46
SCESMS2001G06.g	putative purple acid phosphatase	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC48179	1.8 e-84
SCESMS2001A11.g	Pleckstrin homology domain-containing protein-like	SC18	<i>Z. Mays</i>	TC338143	2.3 e-38
SCESMS2001G05.g	legumain-like protease	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC48351	9.5 e-36
SCESMS2003C02.g	C13 endopeptidase NP1 precursor	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC48351	1.5 e-16
SCESMS2003C08.g	Horcolin, partial	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC57488	2.4 e-23
SCESMS2003A03.g	putative senescence-associated protein	SC18	<i>P. sativum</i>	BAB33410	2.4 e-40
SCESMS2001D02.g	putative G-box binding protein	SC18	<i>T. aestivum</i>	TC239551	2.1 e-43
SCESMS2001A10.g	Sem homologia	SC19			
SCESMS2002D01.g	Sem homologia	SC19			

Em raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas por *G. clarum*, em condições de baixo P e 12 SAI, foram identificados vários genes com expressão putativamente induzida em relação a raízes micorrizadas, nas mesmas condições (biblioteca MS3). Dentre esses genes alguns são de interesse para explicar quais são os possíveis mecanismos que são ativados em baixo P. O gene SCESMS3001C06, o qual codifica uma proteína induzida por jasmonato, durante o desenvolvimento de doenças em plantas (GRUNWALD et al., 2007). Outro gene de interesse é o

SCESMS3001F02 (catalase-3-isoenzyme) o qual codifica uma catalase relacionada ao estresse oxidativo e envolvida na destoxificação de espécies reativas de oxigênio (LAMBAIS et al., 2003) (Tabela 5).

Tabela 5 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS3001H06.g	methionine synthase protein	SC1	<i>Z. mays</i>	TC346977	1.1 e-67
SCESMS3003H11.g	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	SC1	<i>S. officinarum</i>	TC57018	4.6 e-75
SCESMS3001F07.g	Enolase 1 (2-phosphoglycerate dehydratase 1)	SC2	<i>Z. mays</i>	TC315984	9.8 e-44
SCESMS3003E06.g	beta-glucosidase homolog F8K4.3	SC2	<i>A. thaliana</i>	AC004392	2 e-49
SCESMS3001A02.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64685	2.8 e-69
SCESMS3001D03.g	S-adenosylmethionine synthetase	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC48005	3.4 e-44
SCESMS3003A09.g	histone H3.2 protein	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC64822	6.6 e-79
SCESMS3003H03.g	tubulin alpha chain 2	SC4	<i>T. aestivum</i>	TC264360	5.8 e-56
SCESMS3004E09.g	tubulin alpha 2 chain	SC4	<i>T. aestivum</i>	TC264360	1.2 e-59
SCESMS3001A10.g	translationally controlled tumor protein-like protein	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC 56998	6 e-42
SCESMS3004A09.g	endo-1,4-beta-gluS. Officinarumse Cell	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC57326	7.1 e-88
SCESMS3001A01.g	Nucleoside diphosphate kinase I	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC66611	7.5 e-54
SCESMS3001A07.g	Putative S-phase-specific ribosomal protein	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65087	5.5 e-28
SCESMS3003B04.g	Ubiquitin-protein ligase	SC11	<i>T. aestivum</i>	P25866	9 e -69
SCESMS3004B11.g	cysteine protease component of protease-inhibitor complex	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC48759	2.4 e-44
SCESMS3001E08.g	ubiquitin-conjugating enzyme	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC57030	4.6 e-74
SCESMS3001A05.g	ubiquitin conjugating enzyme	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC49336	6.4 e-71
SCESMS3004B10.g	unknown protein	SC13	<i>O. sativa</i>	NM_001073357	9 e-41
SCESMS3004A10.g	S-adenosylmethionine decarboxylase 2	SC13	<i>S. officinarum</i>	EF467294	1 e-86

Tabela 5 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de baixo P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

					(conclusão)
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS3001C06.g	dirigent (jasmonate-induced protein homolog)	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC68011	4.5 e-71
SCESMS3001F02.g	catalase-3 isoenzyme	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC56930	2.3 e-24
SCESMS3003A10.g	abscisic acid- and Drought inducible protein	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC57058	3.1 e-34
SCESMS3003D09.g	wali7	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC56763	1.6 e-70
SCESMS3003F06.g	Putative aspartic protease oryzasin	SC15	<i>Z. mays</i>	TC326589	2.9 e-45
SCESMS3004F12.g	drought-induced protein Di19	SC15	<i>A. thaliana</i>	X78584	1 e-53
SCESMS3001B02.g	sugar transporter protein	SC16	<i>A thaliana</i>	AB026654	2 e-48
SCESMS3001C07.g	unknow-exporting ATPase	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC65156	1.8 e-42
SCESMS3004B12.g	adenine nucleotide ADP,ATP unknown protein 1, mitochondrial	SC16	<i>T. aestivum</i>	TC264287	1.9 e-35
SCESMS3004F11.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC48237	1.5 e-33
SCESMS3004A11.g	Putative RNA-binding protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	AY596616	1 e-93
SCESMS3004H11.g	putative purple acid phosphatase-like protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC48292	5.8 e-38
SCESMS3001A04.g	ADP ribosylation GTPase-like protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC59091	2.4 e-114
SCESMS3004C11.g	unnamed protein product adenine nucleotid	SC18	<i>Z. mays</i>	X57556	8 e-94
SCESMS3004C12.g	C13 endopeptidase NP1 precursor	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC48351	5.8 e-43
SCESMS3003C10.g	putative G-box binding protein	SC18	<i>O. sativa</i>	AF466286	4 e-44
SCESMS3001C03.g	Orf122 like protein	SC18	<i>C. tepidum</i>	AF287482	9 e-66
SCESMS3003A12.g	No hits were found.	SC19			
SCESMS3004F10.g	No hits were found.	SC19			

Em raízes de cana-de-açúcar inoculadas por *G. clarum*, em condições de alto P e 12 SAI, foram identificados vários genes com expressão putativamente induzida em relação a raízes não micorrizadas, nas mesmas condições (biblioteca MS4). Na biblioteca MS4 foram encontrados

genes como SCESMS4003F03 (CYB5 Cytochrome B5), associado com processos de oxirredução. Outro dos genes encontrados foi o SCESMS4004A02 o qual codifica uma proteína homóloga a profilina que se liga à actina monomérica (G-actina) e modifica sua polimerização (THERIOT; MITCHISON, 1993). Além da actina, a profilina pode-se ligar a fosfoinositois e proteínas ricas em prolina, atuando como vínculo entre a transdução do sinal e as mudanças produzidas na arquitetura celular. Esta proteína pode também ser fosforilada pela proteína quinase C (LIMMONGKON et al., 2004; VEMURI; SINGH, 2001). A indução do gene SCESMS4002C10 que codifica uma provável aquaporina de tonoplasto em raízes micorrizadas em alto P sugere um maior transporte de água e solutos pequenos não carregados em condições de alto P em raízes micorrizadas. Tem sido sugerido que as aquaporinas localizadas na membrana periarbuscular das raízes micorrizadas de *M. truncatula* participariam em um sistema de transporte de baixa afinidade de amônia ou amônio (UEHLEIN et al., 2006) (Tabela 6).

Tabela 6 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de alto P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS4004F06.g	1,4-benzoquinone reductase-like / Trp repressor binding protein-like	SC2	<i>A. thaliana</i>	AB026634	2 e-26
SCESMS4003B04.g	1,4-benzoquinone reductase-like / Trp repressor binding protein-like	SC2	<i>A. thaliana</i>	AB026634	3 e-30
SCESMS4003F03.g	CYB5 Cytochrome B5	SC2	<i>O. sativa</i>	X75670	1 e-27
SCESMS4001C12.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64685	1.7 e-91
SCESMS4002H11.g	Cytochrome reductase	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC56730	1.0 e-33
SCESMS4001A12.g	casein kinase II alpha	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC57639	1.5 e-83
SCESMS4004A02.g	profilin 5	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC56332	5.4 e-43
SCESMS4004C03.g	ESTs similar to Arabidopsis thaliana chromosome 4	SC10	<i>A. thaliana</i>	AP002902	5 e-52
SCESMS4004A04.g	DnaJ protein-like	SC11	<i>A. thaliana</i>	AB025622	9 e-10
SCESMS4004B11.g	ribosomal protein L35-like – protein	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC57186	4.1 e-22
SCESMS4004G09.g	probable chaperonin-containing TCP-1 complex gamma chain F9D12.18	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC48072	1.6 e-39

Tabela 6 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de alto P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

(conclusão)					
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS4004H02.g	ribosomal S29-like protein	SC11	<i>A. thaliana</i>	AL163975	3 e-22
SCESMS4002B12.g	ubiquitin-specific protease 6	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC57729	1.5 e-32
SCESMS4002G12.g	putative tetratricopeptide repeat protein	SC11	<i>O. sativa</i>	AAP54357	8.6 e-35
SCESMS4002A10.g	putative beta-1,4-mannosyl-glycoprotein b	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC65550	2.6 e-31
SCESMS4004B06.g	Beta3-glucoroniltransferase	SC13	<i>T. aestivum</i>	TC248771	1.8 e-4
SCESMS4002C10.g	probable tonoplast aquaporin	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC56424	7.3 e-29
SCESMS4001B12.g	unknown protein	SC17	<i>A. thaliana</i>	AC074176	2 e-87
SCESMS4001F12.g	Proteína expressa	SC17	<i>Z. mays</i>	TC341867	5.1 e-56
SCESMS4004B07.g	photolyase type II CPD	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC71465	2.2 e-17
SCESMS4002B11.g	hypothetical protein F22K18.110 similar a At4g24690	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC65291	2.0 e-42
SCESMS4004D11.g	Sem homologia	SC19			

Genes com expressão putativamente induzida em raízes não-inoculadas, 12 SAI em alto P foram identificados na biblioteca MS5. Dentre esses genes, um gene homólogo a SCESMS5002A08.g, o qual codifica uma proteína similar a metalotioneína do grupo I. Em interações planta – patógeno, foi demonstrado que as metalotioneínas são essenciais para a infecção do hospedeiro pelo patógeno, e que as metalotioneínas são poderosos antioxidantes, podendo atuar durante o processo de infecção como um doador de elétrons, destoxificando espécies reativas de oxigênio (Tabela 7).

Tabela 7 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de alto P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS5002B01.g	glycine hydroxymethyltransferase-like protein	SC1	<i>Z. mays</i>	AF498507	2 e-26
SCESMS5002D08.g	glutamine synthetase	SC1	<i>S. officinarum</i>	AY835453	3 e-30

Tabela 7 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de alto P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

(continua)

Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS5001H11.g	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 1	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC64685	6.6 e-94
SCESMS5001D08.g	fructokinase 2	SC2	<i>S. officinarum</i>	TC48841	1.2 e-34
SCESMS5002F09.g	glutamine synthetase	SC2	<i>S. officinarum</i>	AY835453	8 e-28
SCESMS5002B07.g	glutamine synthetase	SC2	<i>S. officinarum</i>	AY835453	5 e-25
SCESMS5001F04.g	protein phosphatase 2C-like protein	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC58159	6.6 e-47
SCESMS5002A03.g	hypothetical Cys-3-His zinc finger protein	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC65956	5.4 e-19
SCESMS5002F08.g	S-adenosylmethionine synthetase 1	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC48005	2.8 e-15
SCESMS5003B08.g	S-adenosylmethionine synthetase 1	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC48005	2.1 e-14
SCESMS5001F11.g	casein kinase II alpha	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC57639	8.8 e-82
SCESMS5002D04.g	protein kinase-like	SC3	<i>S. officinarum</i>	TC59350	4.5 e-30
SCESMS5002E05.g	WRKY transcription factor	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC48073	3.3 e-8
SCESMS5003D10.g	glycine-rich RNA-binding protein	SC4	<i>S. officinarum</i>	TC56893	4.4 e-13
SCESMS5002B06.g	auxin-repressed protein	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC48710	1.3 e-13
SCESMS5002F02.g	ethylene responsive element binding factor-like protein	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC49141	4.1 e-13
SCESMS5002G09.g	auxin-repressed protein	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC48715	1.6 e-37
SCESMS5002F04.g	Ripening-related protein-like	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC58318	9.3 e-22
SCESMS5002C05.g	Adhesive/proline-rich protein homolog-like protein	SC10	<i>S. officinarum</i>	TC56791	2.6 e-24
SCESMS5001A05.g	DnaJ protein, putative	SC11	<i>S. officinarum</i>	TC47970	2.5 e-28
SCESMS5001F08.g	high mobility group protein HMgd1	SC12	<i>S. officinarum</i>	TC47957	1.8 e-28
SCESMS5002C06.g	Metalloproteinase domain	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC48325	1.5 e-38
SCESMS5002C08.g	metallothionein-like protein type I	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC47985	6.5 e-14
SCESMS5002D07.g	metallothionein-like protein type I	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC48217	1.5 e-26

Tabela 7 - Genes com expressão induzida putativa em raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas por *G. clarum* 12 SAI, em condições de alto P, identificados por sequenciamento de ESTs, de bibliotecas subtrativas supressivas

(conclusão)					
Cluster	Anotação	Função	Organismo	Acesso	E value
SCESMS5002A06.g	metallothionein-like protein type I	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC48217	2.4 e-19
SCESMS5001A01.g	EREBP-4 like protein	SC15	<i>S. officinarum</i>	TC50119	2.3 e-40
SCESMS5003A08.g	metallothionein-like protein	SC16	<i>O. sativa</i>	S57768	6 e-39
SCESMS5003C11.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>O. sativa</i>	S57768	3 e-10
SCESMS5003D09.g	ABC transporter	SC16	<i>O. sativa</i>	TC284891	2.2 e-16
SCESMS5002A08.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC48237	8.7 e-28
SCESMS5002B02.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	CA285269	1.6 e-26
SCESMS5002A07.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC48237	3.9 e-16
SCESMS5001A04.g	metallothionein-like protein type I	SC16	<i>S. officinarum</i>	TC48237	1.8 e-23
SCESMS5001E11.g	unknown protein	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC67325	9.8 e-67
SCESMS5002E04.g	unknown protein	SC17	<i>A. thaliana</i>	AC018363	1 e-25
SCESMS5003D07.g	hypothetical protein	SC17	<i>A. thaliana</i>	AL353993	1 e-30
SCESMS5001B11.g	unknown protein	SC17	<i>O. sativa</i>	AK066146	2 e-58
SCESMS5001B10.g	putative uridylyl transferase	SC17	<i>S. officinarum</i>	TC48519	2.4 e-28
SCESMS5002B04.g	similarity to nknown protein	SC17	<i>A. thaliana</i>	AB026649	4e -22
SCESMS5002E09.g	Q9DUC7 (Q9DUC7) ORF1	SC18	<i>S. officinarum</i>	TC57119	8.1 e-20
SCESMS5001D11.g	Sem homologia	SC19			
SCESMS5002C02.g	Sem homologia	SC19			
SCESMS5002D06.g	Sem homologia	SC19			

Tabela 8 - Variação no acúmulo de transcritos em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em condições de baixo P ao longo do desenvolvimento da simbiose, em relação ao tratamento não-inoculado. A quantificação de transcritos foi feita por RT-PCR quantitativo em tempo real. Os valores expressam quantas vezes cada gene foi induzido ou suprimido, em relação ao controle

Gene	Anotação	Semanas após inoculação				
		4	6	8	10	12
SCESMS2001C02.g	cysteine protease component of protease-inhibitor complex	0,38 (2,63)	na	na	na	76,99*
SCESMS2001F05.g	Remorin (pp34)	0,55 (1,82)	0,01*(100)	6,25*	5,98*	6,08*
SCESMS2001B08.g	dehydroascorbate reductase	0,22*(4,54)	0,01*(100)	0,13*(7,7)	0,01*(100)	5,44*
SCESMS2001C11.g	Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP	0,14*(7,14)	0,1*(10)	1,84	13,94*	8,87*
SCESMS2003A03.g	putative senescence-associated protein	0,16*(6,25)	27,42*	2,63	5,33*	0,28*(3,57)
SCESMS2003C08.g	Horcolin	0,33*(3,03)	0,05*(20)	10,59*	0,01*(100)	7,51*

Valores < 1 significam supressão, na: não amplificou, * valores com diferenças significativas, teste Student's (p<0,0001). Valores entre parêntese indicam o valor inverso do $\Delta\Delta Ct$ (as vezes que o gene no controle foi induzido frente ao tratamento)

2.3.6 Identificação de genes com expressão diferencial por hibridização em macroarranjos de cDNA

Os genes usados na impressão das membranas de náilon foram escolhidos por apresentarem expressão diferencial putativa, determinada por análise “*in silico*” (TAKAHASHI, 2005). Os genes espotados na membrana foram classificados em 16 categorias funcionais (tabela 9). As categorias função não-definida (SC18), resposta a estresses (SC15) e metabolismo de RNA e transcrição (SC12) representaram mais do 51% dos genes.

Tabela 9 - Classificação dos genes representados nas membranas, de acordo com sua provável função biológica e proporção de genes que apresentaram expressão diferencial significativa em raízes micorrizadas com 8 SAI

Categorias	Função biológica	nº de clusters impressos	Genes com expressão diferencial (%)
SC1	Metabolismo de aminoácido	12	83
SC2	Bioenergéticos	39	56
SC3	Transdução de sinais	26	50
SC4	Dinâmica celular	10	90
SC5	Metabolismo de DNA	6	66
SC6	Metabolismo de lipídeos	3	100
SC7	Elementos genéticos móveis	1	0
SC8	Metabolismo de N, P, S	0	0
SC9	Metabolismo de nucleotídeo	2	0
SC10	Crescimento e desenvolvimento da planta	0	0
SC11	Metabolismo de proteínas	25	48
SC12	Metabolismo de RNA e transcrição	50	60
SC13	Metabolismo secundário	21	38
SC14	Armazenamento de proteínas	0	0
SC15	Resposta ao estresses	40	70
SC16	Transporte	25	52
SC17	Proteína putativa	1	100
SC18	Não Definida (ND)	102	50

Os dados de intensidade do sinal da hibridização em cada membrana permitiram verificar a variação nas intensidades dos sinais de hibridização dos genes controles (actina, β tubulina e factor de alongação α) em diferentes regiões da membrana. Em geral, a intensidades do sinal de hibridização do factor de alongação α foram maiores em toda a membrana do que a intensidade dos outros genes controle (Figura 3).

A qualidade das repetições entre membranas do mesmo tratamento são apresentados na Figura 4. Os resultados mostraram que as repetições apresentaram uma boa qualidade já que todos os genes formam um agrupamento bem definido e não há pontos fora desse agrupamento.

Os genes diferencialmente expressos ao nível de significância de 5% são apresentados na Figura 5. Nessa figura são apresentados os genes que foram diferencialmente expressos tanto em 4 como em 12 semanas, totalizando 101 genes (pontos amarelos)

Figura 3 - Distribuição espacial da intensidade do sinal de hibridização ($\log_2$) dos genes controles na membrana. (Actina: azul; β -tubulina: vermelho; e factor de alongação α : verde)

Figura 4 - Qualidade de repetições dos sinais de hibridização em macroarranjos de cDNA, utilizando transcritos reversos de raízes micorrizadas 12 semanas após a inoculação.
(Verde: actina, amarelo: β tubulina, vermelho: factor de elongação α , branco: outros genes)

Figura 5 - Valores de probabilidade ($\log_{10}$) das diferenças estimadas (médias dos quadrados mínimo) entre nível de transcritos das raízes micorrizadas em relação ao controle não-inoculado. Verde: diferenças não-significativa. Amarelo: genes com expressão diferencial significativa (teste t, $p < 0,05$)

A categoria não-definida (ND) (SC18) foi a que apresentou maior número de genes com expressão diferencial nas raízes de 4 SAI. As outras categorias contendo grande número de genes com expressão diferencial nas raízes com 4 SAI foram: Bioenergéticos (SC2), Metabolismo de proteínas (SC11), Metabolismo de RNA e transcrição (SC12) e de Transporte (SC16). Nas raízes com 12 SAI, as categorias com maior número de genes com expressão diferencial significativa foram a ND (SC18), Metabolismo de proteínas (SC11) e Metabolismo de lipídeos (SC6) (Tabela 4).

Dos 384 genes analisados, 101 (27%) foram diferencialmente expressos nos tratamentos ($p < 0,05$). Destes genes, 36 foram diferencialmente expressos nas raízes micorrizadas com 4 SAI, em condições de baixo P, 18 deles (50%) foram suprimidos e 18 (50%) induzidos em raízes micorrizadas. Nas raízes micorrizadas com 12 SAI, em condições de baixo P, 65 genes foram diferencialmente expressos, 24 deles (37%) suprimidos e 41 (63%) induzidos em raízes micorrizadas (Tabela 11).

Tabela 10 - Porcentagem de genes dos macroarranjos diferencialmente expressos em raízes micorrizadas em condições de baixo P, 4 e 12 SAI, em cada categoria funcional

Categoria	Função biológica	nº de clusters impressos	nº de clusters diferencialmente expressos		% de clusters diferencialmente expressos	
			4	12	4	12
			semanas	semanas	semanas	semanas
SC1	Metabolismo de aminoácido	12	0	2	0	17
SC2	Bioenergéticos	39	6	6	13	15
SC3	Transdução de sinais	26	2	4	11	15
SC4	Dinâmica celular	10	0	1	10	10
SC5	Metabolismo de DNA	6	0	1	0	33
SC6	Metabolismo de lipídeos	3	0	1	0	33
SC7	Elementos genéticos móveis	1	0	0	0	0
SC9	Metabolismo de nucleotídeo	2	1	0	50	0
SC11	Metabolismo de proteínas	25	4	8	16	32
SC12	Metabolismo de RNA e transcrição	50	5	8	10	18
SC13	Metabolismo secundário	21	3	3	14	14
SC15	Resposta ao estresses	40	2	3	5	7,5
SC16	Transporte	25	4	4	16	16
SC17	Proteína putativa	1	0	0	0	0
SC18	Não Definida (ND)	93	7	20	7,5	21
SC19	Constitutiva	9	2	4	22	44

Dentre as proteínas codificadas pelos genes que apresentaram aumento no acúmulo de transcritos devido à presença do FMA nas raízes de 4 semanas, se destacam uma proteína relacionada com o metabolismo de fitohormônios como COI1 MY2005G03, a qual foi induzida 2,91 vezes. Tem sido observado que COI1 é necessário para a regulação da resposta de defesa em *Arabidopsis* e gene está envolvido na resposta de defesa mediada pelo ácido jasmônico (AJ) (XIE et al, 1998). O AJ e seu éster metílico (metil-jasmonato, MeJA), encontrados em várias espécies vegetais, são reguladores conhecidos de inúmeros processos fisiológicos em plantas, e desempenham papel importante na regulação da expressão de genes de defesa vegetal (DONG, 1998). Não se conhece completamente a função do AJ no estabelecimento das MAs, muito embora aumentos nos níveis de AJ em raízes de *M. truncatula*, cevada (*Hordeum vulgare*) e outras plantas, quando colonizadas por FMAs, tenham sido observados (HAUSE et al., 2002; HAUSE et al., 2007; STUMPE et al., 2005; VIERHEILIG; PICHE, 2002). Aumentos dos níveis endógenos de AJ e seu aminoácido conjugado, JA-isoleucina, foram observados em raízes de cevada colonizadas por *G. intraradices* (HAUSE et al., 2002). Da mesma forma, foi observado que a aplicação exógena de AJ promove a colonização intrarradicular e aumenta o desenvolvimento de arbúsculos e vesículas em raízes de *Allium sativum* colonizadas por *Glomus* spp. (REGVAR et al., 1996). Por outro lado, a supressão da expressão do gene *MtAOC*, o qual codifica uma óxido aleno ciclase (AOC) envolvida na biossíntese do AJ, em raízes de *M. truncatula*, resulta na redução nos níveis de AJ e formação de MAs por *G. intraradices* (ISAYENKOV et al., 2005). Usando hibridização *in situ* e imunocitoquímica, foi observado que a indução de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do AJ, como AOC e óxido aleno sintase (AOS), além de uma proteína jasmonato-induzida (JIP23), ocorre especificamente nas células do córtex que contêm arbúsculos (HAUSE et al., 2002; ISAYENKOV et al., 2005; MAUCHER et al., 2000). Análises da variação do acúmulo de transcritos de AOS e JIP23 mostraram que o maior acúmulo desses transcritos ocorre 4 a 6 dias após a diferenciação do primeiro arbúsculo (HAUSE et al., 2002), sugerindo que o aumento da concentração de AJ endógeno poderia estar relacionado com a manutenção da simbiose, e não com o reconhecimento dos simbiontes ou o processo de infecção (HAUSE et al., 2002).

A promoção da colonização micorrízica por AJ poderia ocorrer via regulação da explosão oxidativa, a qual ocorre de forma reduzida em raízes colonizadas por FMAs. Análises de hibridização em microarranjos de cDNA mostraram que o MeJA induz o acúmulo de transcritos

de genes codificando proteínas envolvidas na degradação de espécies ativas de oxigênio (EAOs) e na morte celular programada, como catalase, glutathione S-transferase e cisteína protease (SCHENK et al., 2000). A ação dessas enzimas, induzidas por jasmonato, reprimiria o efeito inibitório das EAOs geradas pelo mecanismo de defesa vegetal sobre os FMAs.

Dois genes codificando proteínas relacionadas com o metabolismo de etileno (ET) apresentaram expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum*. Um gene codificando uma proteína responsiva do etileno (MY2008E11) foi induzida 2,62 vezes enquanto um gene codificando o fator de transcrição EREBP1 (MY1003H11) foi suprimido 2,67 vezes em raízes inoculadas com 4 SAI (Tabela 11). Esses genes poderiam estar envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados com as respostas de defesa nas primeiras etapas do desenvolvimento da micorriza (EULGEM et al., 1999; SINGH et al, 2002; CAO et al, 2005; LAO et al., 2008). Outro gene associado ao metabolismo do ET (MY2001A03) apresentou expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas. Esse gene foi suprimido 2,73 vezes em raízes inoculadas com 12 SAI. (MY2001A03) é homólogo com um gene que codifica uma proteína com domínio BTB/POZ. O domínio BTB modula a interação proteína-proteína (COLLINS; STONE; WILLIAMS; 2001) e regula a resposta à fitohormônios em aleurona de cevada (WOODGER; JACOBSEN; GLUBER; 2004). Tem sido observado que proteínas com domínio BTB/POZ participam na regulação de biosíntese de etileno (WANG et al, 2004).

O papel do ET no processo de formação de MAs não é conhecido. O etileno difundido através dos espaços intercelulares poderia agir como um sinal regulador da expressão de genes codificando enzimas envolvidas na degradação das paredes celulares da planta e do fungo, como glucanases e quitinases.

A análise de mutantes de tomateiros super produtor de ET (*epinastic*) e outro insensível ao ET (*Never ripe*), em uma mesma base genética (cv Micro-Tom), mostrou que os mesmos apresentam menor taxa de colonização intrarradicular por *Glomus clarum* do que o genótipo não-mutante, principalmente em condições de baixo P (ZSÖGÖN et al., 2008). Em condições de baixo P, o nível de transcritos codificando uma quitinase básica (*chi9*) é mais elevado nas raízes colonizadas do mutante *epinastic* e *Never ripe* do que do genótipo Micro-Tom, enquanto que os níveis de transcritos de uma β -1,3-glucanase ácida classe III (*TomPR-Q'a*) é menor nas raízes colonizadas do mutante *epinastic* do que no genótipo Micro-Tom. Esses resultados sugerem que

altas concentrações de ET podem ser inibitórias à colonização, mas as baixas concentrações podem estimular o estabelecimento da simbiose, e corroboram os resultados observados por Ishii et al. (1996) com a aplicação exógena de ET. Isso pode ser explicado pelo envolvimento do ET em processos de indução ou supressão da expressão de genes codificando enzimas hidrolíticas, que podem tanto favorecer quanto prevenir a penetração do fungo. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de controle do desenvolvimento das MAs por ET.

O gene MY1002B07, codificando uma proteína semelhante à lipase foi induzido 2,55 vezes em raízes micorrizadas com 12 SAI (Tabela 11). Proteínas similares a lipases são induzidas em respostas a patógenos, e são capazes de ativar a via de sinalização por ácido salicílico em *Arabidopsis* (JAKAB et al., 2003; JIRAGE et al., 1999).

O envolvimento do ácido salicílico (AS) na indução de respostas de defesa vegetal em interações planta-patógenos sugere que esse fitohormônio também poderia agir na regulação de MAs. Em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Herrera-Medina et al. (2003) reportaram que os níveis de AS estão inversamente correlacionados com o grau de colonização intrarradicular. Costa et al. (2000) também constataram diminuição da colonização intraradicular em feijoeiro tratado com AS exógeno, em relação às plantas sem AS. No entanto, nesse estudo, o aumento da concentração de P no solo inibiu a colonização micorrízica de forma independente da aplicação de AS. Com a aplicação de AS, a redução relativa da colonização foi mais pronunciada em condições de alto P no solo do que em condições de baixo P. Em condições de baixo P, a aplicação de AS resultou em níveis de colonização por *G. clarum* comparáveis aos verificados em raízes em condições de alto P e ausência de AS. Foi observado também que a aplicação de AS ao solo inibe a atividade de β -1,3-glucanases, e aumenta a atividade de quitinases nas raízes (COSTA et al., 2000). Dessa forma, o AS regularia a colonização intrarradicular induzindo a atividade de quitinases, as quais poderiam degradar as hifas dos FMAs.

Um mecanismo para permitir a colonização intradicular por FMAs seria a supressão da síntese de AS nas raízes de tabaco, que pode envolver a ação de enzimas do estresse oxidativo. No estudo de Blilou et al. (2000a) foram observados aumentos das atividades de catalase e ascorbato peroxidase em tabaco aos 3 e 5 dias após a inoculação com *G. mosseae*, e um aumento do nível endógeno de AS aos 5 dias. Após esse período, ocorre diminuição da atividade dessas enzimas e dos níveis de AS. É possível que a indução de atividades de catalase e ascorbato peroxidase nas

raízes micorrizadas seja resultado de um estresse oxidativo causado pela infecção pelo FMA, com consequente aumento dos níveis de AS endógeno (Blilou et al., 2000a). Há indícios de que o H_2O_2 resultante do estresse oxidativo ative a ácido-benzóico 2-hidroxilase (AB2-Hase) essencial para a síntese de AS (León et al., 1995). Dessa forma, o aumento de EAOs resultaria em aumento da atividade de AB2-Hase e, portanto, da síntese de AS. Para o crescimento fúngico intrarradicular, a maior atividade de catalase e peroxidase em raízes colonizadas diminuiria o nível de EAOs e, assim, regularia negativamente a atividade de AB2-Hase e a síntese de AS. O acúmulo transiente de AS apenas nos estágios iniciais da MA em raízes de arroz colonizadas por *G. mosseae* (Blilou et al., 2000b) sugere a ocorrência desse tipo de regulação. A diminuição do nível de AS atenua a indução da expressão de outros genes de defesa e isso permitiria maior colonização fúngica.

Sabe-se que durante o desenvolvimento das MAs são expressos diferencialmente genes que estão relacionados com a produção de metabólitos secundários, lignina, compostos fenólicos e suberina, entre outros, os quais poderiam participar no controle do desenvolvimento da simbiose. Em nosso experimento de hibridização em macroarranjos, genes relacionados com a produção desses metabolitos mostraram acúmulo diferencial em raízes micorrizadas 4 e 12 SAI em condições de baixo P.

O gene MY2008A06 codificando uma 3-O-metiltransferase de ácido cafeico (COMT) foi suprimido 2,39 vezes em raízes inoculadas com 12 SAI (Tabela 11). Essa enzima está envolvida na biossíntese de lignina (BHUIYAN et al., 2007) e compostos fenólicos (MORREEL et al, 2004), sugerindo que os FMAs poderiam atenuar as respostas de defesa.

O gene MY1001B04 codificando uma Coclaurina N-metiltransferase envolvida na biossíntese de alcalóides, foi induzido 2,48 vezes em raízes micorrizadas com 12 SAI (Tabela 11). O acúmulo do alcalóide trigonelina foi observado durante a fase pré-simbiótica, em raízes de *Prosopis laevigata* colonizadas com *G. rosea* (ROJAS-ANDRADE, et al., 2002). A concentração de trigonelina aumentou 1,8 vezes na presença de *G. rósea*, sugerindo que o acúmulo desse composto seria um factor regulatório no estabelecimento da simbiose (ROJAS-ANDRADE, et al., 2002).

O gene MY2003A07 codificando uma O-metiltransferase ZRP4 (OMT)) também foi induzido em raízes micorrizadas com 4 SAI (2,93 vezes) (Tabela 11). Esse gene está relacionado

com as respostas de defesa vegetal, modificando no enrijecimento da parede celular. Esse dado sugere uma indução precoce de genes envolvidos na síntese de parede celular, a qual poderia ser atenuada em etapas intermediárias do desenvolvimento de MAs.

Um gene codificando uma proteína relacionada à patogenicidade, MY3004A06, foi induzido 2,87 vezes em raízes micorrizadas com 4 SAI. Esse dado é mais uma evidência que sugere que as proteínas de resposta de defesa da planta à infecção por FMA são ativadas durante o processo de colonização das raízes (SUO; LEUNG, 2002), e que a indução/supressão de mecanismos associados ao sistema de defesa vegetal desempenha um importante papel na colonização e compatibilidade entre os FMAs e seus hospedeiros (LAMBAIS & MEDHY, 1993; GARCÍA-GARRIDO; OCAMPO, 2002) (Tabela 11).

Tabela 11 - Genes com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em condições de baixo fósforo, 4 e 12 semanas após a inoculação

Cluster	Acesso	E value	Organismo	Anotação	Função	4 sem.	12 sem.
MY2003A12	TC49715	e-91	<i>S. officinarum</i>	ATP synthase subunit 9 (H(+)-transporting atp synthase)	SC2	-4,63	
MY3001G02	TC51128	e-58	<i>S. officinarum</i>	Betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH)	SC13	-3,01	
MY1001C04	TC262713	e-99	<i>T. aestivum</i>	Protein translation factor SUI1 homolog (GOS2 protein)	SC11	-2,99	
MY1003C02	CP000076	e-79	<i>Pseudomonas</i>	phosphate ABC SC16r, permease protein	SC16	-2,95	2,66
MY1001C01	BX640421	e-118	<i>Bordetella</i>	putative orotidine 5'-phosphate decarboxylase	SC9	-2,89	
MY1001B06	CP000152	e-47	<i>Burkholderia</i>	Aldo/keto reductase	SC2	-2,87	
MY4003B02	TC101488	e-72	<i>S. bicolor</i>	DNA-binding protein-like	SC12	-2,85	-2,41
MY1001A11	CP000076	e-76	<i>Pseudomonas</i>	activation/secretion protein, TPS family, putative	SC13	-2,69	
MY1003H11	TC48608	e-84	<i>S. officinarum</i>	Transcription factor EREBP1	SC12	-2,67	
MY2003H01	TC65503	e-101	<i>S. officinarum</i>	At5g09570	SC18	-2,66	2,75

Tabela 11 - Genes com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas em condições de baixo fósforo, 4 e 12 semanas após a inoculação

(continua)

Cluster	Acesso	E value	Organismo	Anotação	Função	4 sem.	12 sem.
MY1001H02	SME591788	e-13	<i>Sinorhizobium</i>	Hypothetical transcription regulator protein	SC12	-2,66	
MY1001G02	CP000076	e-59	<i>Pseudomonas</i>	major facilitator family SC16r	SC16	-2,62	-2,62
MY4002H05	TC94328	e-97	<i>S. bicolor</i>	Exportin1 (XPO1) protein	SC16	-2,62	
MY4003C06	TC98656	e-42	<i>S. bicolor</i>	Triose phosphate/phosphate translocator, chloroplast precursor	SC16	-2,53	
MY2008F11	TC47958	e-73	<i>S. officinarum</i>	Alpha-1,4-glucan-protein synthase (UPTG) (Amylogenin)	SC2	-2,51	
MY2001C10	TC261031	e-52	<i>O. sativa</i>	Cytochrome P450 monooxygenase	SC2	-2,5	
MY4003D05	CA156451	e-86	<i>S. officinarum</i>	Sem anotação	SC18	-2,48	
MS1002F07	TC48573	e-86	<i>S. officinarum</i>	Elongation factor 1-alpha	SC11	-2,44	
MY2008C07	TC49709	e-71	<i>S. officinarum</i>	DnaJ protein family-like	SC11	2,28	2,36
MY2001D05	TC67700	e-57	<i>S. officinarum</i>	Chromdomain-containing protein CRD101	SC12	2,48	
MY1002H06	TC67094	e-90	<i>S. officinarum</i>	Phyb1	SC18	2,53	2,79
MY2003G01	TC48886	e-57	<i>O. sativa</i>	60S ribosomal protein	SC19	2,6	2,91
MY2008D11	TC57236	e-56	<i>S. officinarum</i>	Ethylene responsive protein	SC3	2,62	
MY3003C06	TC52470	e-74	<i>S. officinarum</i>	PolyA binding protein, testis-enriched isoform	SC12	2,67	
MY3007C12	TC57220	e-73	<i>S. officinarum</i>	ATP synthase subunit H Probable vacuolar	SC2	2,67	
MY4003E02	TC51297	e-72	<i>S. officinarum</i>	F21B7.1	SC18	2,67	
MY2001H02	XM_385124	e-63	<i>Gibberella</i>	hypothetical protein	SC18	2,73	-2,99
MY2005C06	TC49773	e-47	<i>S. officinarum</i>	40S ribosomal protein S23	SC19	2,77	
MY3003B06	TC305575	e-26	<i>Z. mays</i>	expressed protein	SC18	2,77	
MY1003F08	TC65485	e-112	<i>S. officinarum</i>	Uridine kinase-like protein	SC2	2,81	
MY3004A06	TC65258	e-56	<i>S. officinarum</i>	pathogenesis-related protein-like protein	SC15	2,87	

Tabela 11 - Genes com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas em condições de baixo fósforo, 4 e 12 semanas após a inoculação

(continua)

Cluster	Acesso	E value	Organismo	Anotação	Função	4 sem.	12 sem.
MY2005G03	TC65964	e-49	<i>S. officinarum</i>	COI1	SC3	2,91	
MY2003A07	CD208536	e-77	<i>S. bicolor</i>	O-methyltransferase ZRP4 (EC 2.1.1.-) (OMT)	SC13	2,93	
MY3005G03	TC57662	e-77	<i>S. officinarum</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-3	SC11	2,95	
MY4002B07	CO897536	e-36	<i>S. officinarum</i>	Solute-binding periplasmic protein of iron/siderophore ABC	SC15	3,16	
MY2004A02	NP623862	e-82	<i>Neurospora</i>	hypothetical protein	SC18	3,29	
MY2008G01	TC50285	e-63	<i>S. officinarum</i>	GH28809p (CG13316-PC) (Cg13316-pa)	SC18		-5,03
MY4003A04	TC277679	e-23	<i>O. sativa</i>	Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein-like	SC11		-4,38
MY1002F06	AT2G01140.1	e-133	<i>N. tabacum</i>	fructose-bisphosphate aldolase	SC2		-3,97
MY2008B06	TC49304	e-106	<i>S. officinarum</i>	F6F3.23 protein	SC18		-3,68
MY4002B02	TC314897	e-70	<i>Z. mays</i>	Tetratricopeptide repeat (TPR)	SC11		-3,36
MY1002B02	BX640452	e-30	<i>Bordetella</i>	Complete genome	SC18		-1,71
MY1003A10	CP000094	e-99	<i>Pseudomonas</i>	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	SC12		-3,27
MY2001A09	TC48457	e-131	<i>S. officinarum</i>	18S, 5S repeat unit DNA	SC19		-3,25
MY2001D11	TC48493	e-58	<i>S. officinarum</i>	CG31952-PA	SC18		-3,25
MY2001H04	TC65026	e-90	<i>S. officinarum</i>	Elongation factor 1 gamma-like protein	SC11		-3,25
MY2005E11	TC57050	e-90	<i>S. officinarum</i>	40S ribosomal protein S9	SC19		-3,12
MY1003H05	TC48295	e-88	<i>S. officinarum</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme protein E2,	SC11		-2,79
MY2003G02	TC66706	e-68	<i>S. officinarum</i>	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	SC18		-2,79
MY2001B08	TC58980	e-43	<i>S. officinarum</i>	AT3g62580/T12C14_280	SC18		-2,75
MY2001A03	TC307179	e-107	<i>Z. mays</i>	BTB/POZ domain	SC12		-2,73
MY3002C10	TC56708	e-64	<i>S. officinarum</i>	MADS box protein 1 (M5 protein)	SC12		-2,66

Tabela 11 - Genes com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas em condições de baixo fósforo, 4 e 12 semanas após a inoculação

(continua)

Cluster	Acesso	E value	Organismo	Anotação	Função	4 sem.	12 sem.
MY2004C08	TC91582	e-93	<i>S. bicolor</i>	70 kDa heat shock protein	SC15		-2,62
MY2008E04	TC52457	e-55	<i>S. officinarum</i>	Serine/threonine protein kinase like protein	SC3		-2,46
MY3008F09	BX640451	e-87	<i>Bordetella</i>	putative oligopeptide transport ATP-binding protein	SC16		-2,46
MY2001C06	TC67664	e-113	<i>S. officinarum</i>	tryptophan synthase alpha chain	SC1		-2,43
MY2008A06	TC64952	e-34	<i>S. officinarum</i>	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	SC13		-2,39
MY1001D01	AE016853	e-66	<i>Pseudomonas</i>	rhodanese domain protein/cystathionine beta-lyase	SC13		2,28
MY2009H09	CP000094	e-73	<i>Pseudomonas</i>	Transcriptional Regulator, AraC family	SC12		2,39
MY2005F11	TC65027	e-18	<i>S. officinarum</i>	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	SC11		2,43
MY1001B04	TC306521	e-37	<i>Z. mays</i>	Coclaurine N-methyltransferase	SC13		2,48
MY2001B06	TC66232	e-110	<i>S. officinarum</i>	Ubiquitin thiolesterase otubain-like protein	SC1		2,48
MY1002D10	BX640443	e-73	<i>Bordetella</i>	Putative regulatory protein	SC18		2,51
MY2003G10	CP000076	e-128	<i>Pseudomonas</i>	peptide ABC SC16r, periplasmic peptide-binding protein	SC16		2,51
MY4002E05	CP000076	e-28	<i>Pseudomonas</i>	sensory box histidine kinase e 2-dehydropantoate 2-reductase	SC2		2,53
MY1002B07	TC68785	e-86	<i>S. officinarum</i>	Lipase-like	SC6		2,55
MY2004G01	TC51038	e-64	<i>S. officinarum</i>	WD-40 repeat protein	SC12		2,55
MY1003F01	CF752084	e-59	<i>Z. mays</i>	L-sorbose dehydrogenase	SC2		2,69
MY1003A02	TC66453	e-63	<i>S. officinarum</i>	Seven transmembrane helix receptor	SC3		2,73
MY4002B10	CP000076	e-113	<i>Pseudomonas</i>	NADH-dependent flavin oxidoreductase, Oye family	SC2		2,73
MY1002A10	CP000076	e-85	<i>Pseudomonas</i>	transcriptional regulator, GntR family	SC12		2,77
MY1001D06	TC68163	e-81	<i>S. officinarum</i>	mRNA splicing	SC12		2,87

Tabela 11 - Genes com expressão diferencial significativa ($p < 0,05$) em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas em condições de baixo fósforo, 4 e 12 semanas após a inoculação

(conclusão)						
Cluster	Acesso	E value	Organismo	Anotação	Função	4 sem. 12 sem.
MY3008H11	NP1067393	e-29	<i>A. flavus</i>	putative NADPH-dependent FMN reductase	SC2	2,91
MY1003G08	TC104230	e-97	<i>A. thaliana</i>	glycosyl transferase	SC11	2,93
MS1001G10	TC56427	e-57	<i>S. officinarum</i>	17S ribosomal RNA	SC19	2,95
MY1001H11	TC56338	e-98	<i>S. officinarum</i>	Polyubiquitin	SC11	2,97
MY1002G04	TC70665	e-53	<i>S. officinarum</i>	At3g60680	SC18	2,99
MY1003D01	TC61006	e-98	<i>S. officinarum</i>	Expressed protein	SC18	3,01
MY4002A06	BX640431	e-48	<i>Bordetella</i>	putative exported protein	SC18	3,05
MY1001E11	TC308174	e-73	<i>Z. mays</i>	Membrane-associated salt-inducible protein-like	SC15	3,07
MY2005C07	TC50953	e-51	<i>S. officinarum</i>	ESTs C97742(C62458)	SC18	3,12
MY1001D04	TC65808	e-105	<i>S. officinarum</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3	SC11	3,29
MY3008F05	AE004910	e-67	<i>Pseudomonas</i>	Complete genome	SC18	3,34
MY1001E01	BI075495	e-38	<i>S. bicolor</i>	protein kinase-like	SC3	3,36
MY2005H01	TC48580	e-51	<i>S. officinarum</i>	Histone H2B.4	SC5	3,46
MY1002F04	AE014292	e-98	<i>Brucella</i>	CAIB/BAIF family protein	SC2	3,76
MY1003G04	TC64825	e-49	<i>S. officinarum</i>	Poly(A)-binding protein	SC12	3,81
MY2009D12	TC65019	e-33	<i>S. officinarum</i>	AAD10646.1 (AT3g13460/MRP15_10)	SC18	4
MY2003E04	AE016853	e-62	<i>S. officinarum</i>	urease accessory protein, putative	SC18	4,38
MY4002H06	TC105303	e-70	<i>S. bicolor</i>	Cellulose synthase-like H1	SC4	4,66
MY1003B02	TC65241	e-75	<i>S. officinarum</i>	AP2 domain-containing protein AP210	SC18	4,72
MY1001D11	TC49852	e-113	<i>S. officinarum</i>	Ser-thr protein kinase	SC3	5,58
MY4002A11	CP000094	e-86	<i>Pseudomonas</i>	Imidazolonepropionase	SC15	5,94

2.3.7 Quantificação do acúmulo de transcritos de genes que apresentaram expressão diferencial em macroarranjos por PCR quantitativo

Os pares de primers desenhados para confirmar a expressão de genes que mostraram acúmulo diferencial em macroarranjos hibridizados com cDNA de 4, 8 e 12 semanas por PCR quantitativo estão descritos no Apêndice B.

Para analisar o comportamento dos genes expressos em macroarranjos através do tempo foram escolhidos dois genes entre os que apresentaram acúmulo diferencial de transcritos nas membranas hibridizadas com cDNA de raízes de cana-de-açúcar inoculadas e não-inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P, com 4 e 12 SAI (Tabela 11). O gene SCESMY2005G03, codificando COI1, foi induzido nas membranas hibridizadas com cDNA de raízes micorrizadas de 4 SAI. A análise dos transcritos desse gene por PCR quantitativo ao longo do tempo mostrou acúmulo de 16 vezes em raízes micorrizadas com 6 SAI e de 3 vezes em raízes micorrizadas com 8 SAI (Tabela 12). Com 4 SAI o nível de indução foi de 1,45 vezes, e não foi significativa pela análise estatística utilizada. Esses dados confirmam o resultado obtido por hibridação em macroarranjos, onde esse gene apresentou indução de 2,91 vezes em raízes micorrizadas com 4 SAI.

Nas raízes com 12 SAI, um gene codificando uma proteína acessória de urease foi induzido 2,13 vezes. No entanto, não foi possível confirmar esse resultado por qRT-PCR, já que não houve amplificação, provavelmente devido à baixa abundância de transcritos. Foi demonstrado recentemente que há um aumento na atividade da urease e arginase na hifa intracelular em raízes micorrizadas de cenoura sugerindo a transferência de nitrogênio mediada pelo FMA (CRUZ et al., 2007). A translocação de nitrogênio da hifa intracelular até as raízes das plantas envolve duas enzimas chave no ciclo da urea (CRUZ et al., 2007). O micelio extraradical absorve amônio do solo que é assimilado em glutamina (Gln) via glutamina sintetase (GS). Mediante a ação da argininosuccinato sintase (ASS), o glutamato é transformado em arginina que é transportado até a hifa intracelular. Aqui são ativadas a arginase e urease para transformar a arginina em amônio, o qual é transferido para a raiz e novamente assimilado em Gln via GS (CRUZ et al., 2007).

Devido à importância de genes envolvidos no estresse oxidativo no estabelecimento e desenvolvimento de MAs, três genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas com 8 SAI determinados por hibridização em macroarranjos de cDNA foram selecionados para estudo mais detalhado por qRT-PCR.

O gene SCESMY3006H06 que codifica uma (catalase 3) foi induzido 6,13 vezes em raízes micorrizadas com 8 SAI em condições de alto P, em relação a raízes micorrizadas em condições de baixo P (TAKAHASHI 2005). Esse mesmo gene foi induzido 3 vezes em raízes de cana-de-açúcar colonizadas com *G. clarum* com 8 SAI, em relação ao controle não-inoculado em condições de baixo P (HARDOIM 2006). A quantificação de transcritos desse gene mostraram que foi suprimido 4,17 vezes em raízes micorrizadas com 4 SAI e induzido em raízes micorrizadas com 8 (3,46 vezes), 10 (3,04 vezes) e 12 SAI (15,79 vezes) (Tabela 12). Lambais et al. (2003) observaram que a atividade da catalase aumenta em raízes micorrizadas quando comparada com raízes não-micorrizadas. Em condições de alto P, essa indução é atenuada, sugerindo que as catalases podem participar da regulação do crescimento intrarradicular do fungo e do desenvolvimento das MAs. A degradação de H_2O_2 pelas catalases seria um mecanismo eficiente para atenuar a resposta de defesa da planta, facilitando o crescimento intrarradicular do fungo e sua diferenciação.

Outro dos genes relacionados com estresse oxidativo avaliados foi SCESMY2003B05, codificando uma proteína semelhante a germina 4. Germina fazem parte de uma grande família de proteínas, e participam em inúmeros processos de importância para o desenvolvimento da planta e ativação do sistema de defesa (BERNIER; BERNA, 2001). Análises cristalográficas dessa proteína mostraram que elas têm atividade enzimática bifuncional, de oxalato oxidase e de superóxido dismutase (SOD) (WOO et al, 2000). O gene SCESMY2003B05 apresentou indução de 2,1 vezes em raízes micorrizadas e cultivadas em condições de baixo P, em relação aos controles não-inoculados cultivados na mesma dose de P, em análises de hibridização em macroarranjos (TAKAHASHI 2005). Os resultados de qRT-PCR mostraram que SCESMY2003B05 foi induzido 351 vezes em raízes micorrizadas com 6 SAI e suprimido 14 e 100 vezes em raízes micorrizadas com 10 e 12 SAI, respectivamente (Tabela 12). Resultados similares foram obtidos por Doll et al (2003), os quais constataram aumento no número de transcritos do gene *MtGlp1* codificando germina em raízes de *M. truncatula* colonizadas por *G.*

intraradices, e por Lambais, Rios-Ruiz e Andrade (2003), os quais verificaram aumento na atividade SOD em raízes de feijão colonizadas por *G. clarum*. SOD participa no processo de destoxificação de espécies ativas de oxigênio (EAO), convertendo O_2^- em H_2O_2 , contribuindo para a atenuação das respostas de defesa em raízes micorrizadas.

Outro gene relacionado ao estresse oxidativo é SCESMY2003B10 codificando uma glutathione transferase III foi induzido 1,9 vezes em raízes micorrizadas com 8 SAI em condições de baixo P, em relação aos controles não-inoculados (TAKAHASHI 2005). As análises de transcritos desse gene por qRT-PCR mostrou uma indução de 27 vezes em raízes micorrizadas com 6 SAI, e uma supressão de 14 vezes em raízes micorrizadas com 12 SAI (Tabela 12). A glutathione S-transferase é capaz de catalizar a redução de H_2O_2 usando a glutathione como intermediário (Noctor, Foyer, 1998). Esse gene foi induzido nas etapas precoces de reconhecimento e de desenvolvimento do apressório em raízes de *Petroselinum crispus* colonizadas por *G. mosseae* (BREUNINGER; REQUENA, 2004).

Um gene codificando uma quitinase tipo III também foi avaliado por qRT-PCR (SCESMY3003C03). O acúmulo de transcritos desse gene apresentou supressão de aproximadamente 8 vezes em raízes micorrizadas quando comparadas com o controle sem inoculação (HARDOIM 2006). No entanto, os resultados de qRT-PCR não mostraram diferenças significativas nos cinco estados de desenvolvimento avaliados (Tabela 12). Esses resultados poderiam ser explicados pelo fato de existirem várias isoformas de quitinases que são diferencialmente expressas em raízes micorrizadas (LAMBAIS, 2000).

O acúmulo de transcritos do gene SCESMY2008B05 codificando uma proteína associada com senescência de folhas também foi avaliado por qRT-PCR. O acúmulo de transcritos desse gene foi induzido em raízes micorrizadas com 8 SAI e tratadas com herbicida Imazapique (HARDOIM 2006), e suprimido em raízes micorrizadas com 8 SAI inoculadas em alto P, quando comparado com raízes de 8 semanas em condições de baixo P (TAKAHASHI 2005). Na avaliação realizada por qRT-PCR esse gene foi induzido 110 vezes em raízes micorrizadas com 6 SAI e suprimido 50 vezes em raízes micorrizadas com 10 SAI, e 2 vezes em raízes com 12 SAI (Tabela 12). Os resultados obtidos sugerem que esse gene poderia estar relacionado com o processo de senescência do arbúsculo.

O gene SCESMY2008E01 que codifica a proteína WALI7 foi suprimido 21 vezes em raízes inoculadas com 8 SAI quando comparado com raízes não-inoculadas com 8 semanas (HARDOIM 2006). Em nosso experimento esse gene não mostrou um acúmulo de transcrito diferencialmente regulado através do tempo (Tabela 12).

O gene SCESMY2005D02 codificando o precursor de uma proteinase aspartica apresentou expressão induzida 0,54 vezes em raízes inoculadas de 8 semanas em condições de baixo P, e expressão suprimida 1,15 vezes em condições de alto P, em relação ao controle não-inoculado (TAKAHASHI 2005). A avaliação do comportamento desse gene através do tempo mostrou que em nosso experimento a protease aspártica foi suprimida 4 vezes em 6 semanas e 5 vezes em 12 semanas em condições de baixo P (Tabela 12). Em sistemas patogênicos o fungo *Botritis cineria* secreta grandes quantidades de proteinase aspártica que pode ter papel essencial no processo de infecção.

Tabela 12 - Variação no acúmulo de transcritos em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em condições de baixo P ao longo do desenvolvimento da simbiose, em relação ao tratamento não-inoculado. A quantificação de transcritos foi feita por RT-PCR quantitativo em tempo real. Os valores expressam quantas vezes foi induzido ou suprimido cada gene.

Gene	Anotação	Semanas após inoculação				
		4	6	8	10	12
SCESMY3006H06	Catalase isoenzima 3	0,24*(4,17)	0,8 (1,25)	3,46*	3,04*	15,79*
SCESMY3003C03	Quitinase tipo III	0,34*(2,94)	1,04	0,82 (1,22)	2,12	2,36
SCESMY2008B05	Leaf senescence related protein-like	2,3	110,78*	2,4	0,02*(50)	0,47 (2,13)
SCESMY2005G03	COI1	1,45	16,03*	3,03*	1	1,01
SCESMY2003B05	Germin-like protein 4	2,19	351,19*	1,94	0,07*(14,3)	0,01*(100)
SCESMY2003B10	Glutathione transferase III (B)	1,49	27,26*	1,4	1,16	0,07*(14,3)
SCESMY2005D02	Precursor aspartic proteinase	1,06	0,23*(4,35)	1,75	na	0,18*(5,55)
SCESMY2008E01	WALI7	1,29	0,01*(100)	na	na	0,79 (1,26)

Valores < 1 significam supressão, na: não amplificou, * valores com diferenças significativas, teste Student's (p<0,0001). Valores entre parêntese indicam o valor inverso do $\Delta\Delta C_t$ (as vezes que o gene no controle foi induzido frente ao tratamento)

3 CONCLUSÕES

A construção das bibliotecas SSH e a hibridização em macroarranjos foi eficiente na identificação de genes com expressão diferencial em MAs os quais poderiam participar no estabelecimento e desenvolvimento da simbiose. A expressão diferencial de vários genes foi confirmado por qRT-PCR. O envolvimento desses genes no controle da simbiose deverá, no entanto, ser determinado com experimentos adicionais com plantas modelos sob diferentes condições edáficas.

Foi observado que genes envolvidos no estresse oxidativo e metabolismo de fitohormônios são altamente regulados em MA, e poderiam estar diretamente envolvidos no estabelecimento e desenvolvimento da simbiose. Ainda está muito longe de ser descrito o processo completo do desenvolvimento das MAs, principalmente em cana-de-açúcar, com a qual as dificuldades na obtenção de mutantes para confirmar os resultados obtidos podem inviabilizar os estudos.

A utilização de genótipos mutantes fúngicos e vegetais no estudo da regulação de MAs seria fundamental para entender os mecanismos que governam o crescimento fúngico e diferenciação do FMAs, bem como a eficiência da simbiose.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, K.L.; WENDEL, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n.2, p. 135–141, Apr. 2005.
- AHONEN-JONNARTH, U.; GÖRANSSON, A.; FINLAY, R.D. Growth and nutrient uptake of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings treated with elevated Al concentrations. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, n. 3, p.157-167, Feb. 2003.
- AHONEN-JONNARTH, U.; VAN HEES, P.A.W.; LUNDSTRÖM, U.S.; FINLAY, R.D. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. **New Phytologist**, New York, v. 146, n. 3, p. 557-567, Jun. 2000.
- AKIYAMA, K. Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokio, v. 71, n. 6, p. 1405-1414, Jun. 2007.
- AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokio, v.66, n. 4 p. 762-767, Apr. 2002.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London. v. 435, n. 7043, p. 824-827. Jun. 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, Sept. 1997.
- ANÉ, J.M.; KISS, G.B.; RIELY, B.K.; PENMETSA, R.V.; OLDROYD, G.E.D.; AYAX, C.; LEVY, J.; DEBELLE, F.; BAEK, J.M.; KALO, P.; ROSEMBERG, C.; ROE, B.A.; LONG, S.R.; DENARIE, J.; COOK, D.R. *Medicago truncatula DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. **Science**, Washington, v. 303, n. 5662, p. 1364-1367, Feb. 2004.
- ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v.24, n. 1/4, Editorial, 2001.
- BALESTRINI, R.; JOSEESTANYOL, M.; PUIGDOMENECH, P.; BONFANTE, P. Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by in situ hybridization. **Protoplasma**, Vienna, v. 198, n. 1-2, p. 36-42, 1997.
- BENITEZ, Y.; BOTELLA, M.A.; TRAPERO, A.; ALSALIMIYA, M.; CABALLERO, J.M.; DORADO, G.; BLANCO, J.M. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. **Pathology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 425-438, Jul. 2005.
- BERNIER, F; BERNA, A. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 7/8, p. 545-554, Jul./Aug. 2001.

BHUIYAN, N.H.; LIU, W.P.; LIU, G.S.; SELVARAJ, G.; WEI, Y.D.; KING, J. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 64, n. 3, p. 305-318, Jun 2007.

BLILOU, I.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 353, p. 1969-1977, Dec 2000.

BLILOU, I.; BUENO, P.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. **Mycological Research**, New York, v. 104, n.6, p. 722-725, Jun 2000.

BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 189-207, Jul 1991.

BONFANTE, P.; GENRE, A.; FACCIO, A.; MARTINI, I.; SCHAUER, L.; STOUGAARD, J.; WEBB, J.; PARNISKE, M. The *Lotus japonicus* ljsym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St Paul, v.13, n. 10, p. 1109-1120, Oct 2000.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.). **VA Mycorrhizae**. Boca Raton: CRC Press, 1984. chap. 1, p. 5-33.

BRECHENMACHER, L.; WEIDMANN, S.; VAN TUINEN, D.; CHATAGNIER, O.; GIANINAZZI, S.; FRANKEN, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. **Mycorrhiza**, New York, v. 14, n. 4, p. 253-262, Aug. 2004.

BREUNINGER, M.; REQUENA, N. Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 41, n. 8, p. 794-804, Aug. 2004.

BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, Oxford, v.154, n. 2, p.275-304, May. 2002.

BUÉE, M.; ROSSIGNAL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v.13, n. 6, p.693-698, Jun. 2000.

BURLEIGH, S.H.; HARRISON, M.J. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 199-208, May 1997.

CAO, Y.F.; WU, Y.F.; ZHENG, Z.; SONG, F.M. Overexpression of the rice EREBP-like gene OsBIERF3 enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3-5, p. 202-211, Sep./Oct. 2005.

CHABAUD, M.; VENARD, C.; DEFAUX-PETRAS, A.; BÉCARD, G.; BARKER, D.G. Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.156, n. 2, p.265-273, Nov 2002.

CHEN, F.Q.; FOOLAD, M.R. Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 6, p. 821-831, Dec. 1997.

COLLINS, T.; STONE, J.R.; WILLIAMS, A.J. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 21, n. 11, p. 3609-3615, Jun. 2001.

COSTA, H.S.; RÍOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e b-1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba., v. 57, n. 1, p.19-25, Mar. 2000.

COSTA, M.C.G. **Eficiência agrônômica de fontes de nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar em sistema de colheita sem despalha a fogo**. PA. 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CRUZ, C.; EGSGAARD, H.; TRUJILLO, C.; AMBUS, P.; REQUENA, N.; MARTINS-LOUCAO, M.A.; JAKOBSEN, I. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 2, p. 782-792, Jun 2007.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* · *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 847–854, Apr. 2004.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n.1/3, p. 27–33, 2005.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 250, n. 4, p. 405–413, Mar. 1996.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 221–225, Apr. 1998.

DASSI, B.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 52, n. 3, p. 167-183, Mar. 1998.

DEGUCHI, Y.; BANBA, M.; SHIMODA, Y.; CHECHETKA, S.A.; SUZURI, R.; OKUSAKO, Y.; OOKI, Y.; TOYOKURA, K.; SUZUKI, A.; UCHIUMI, T.; HIGASHI, S.; ABE, M.; KOUCHI, H.; IZUI, K.; HATA, S. Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during

arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation **DNA Research**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 117-133, Jun. 2007.

DELP, G.; SMITH, S.E.; BARKER, S.J. Isolation by differential display of three partial cDNAs potentially coding for proteins from the VA mycorrhizal *Glomus intraradices*. **Mycological Research**, New York, v.104, n. 3, p.293-300, Mar. 2000.

DEMCHENKO K., WINZER T., STOUGAARD J., PARNISKE M., PAWLOWSKI K. Distint roles of *Lotus japonicum* *SYMRK* and *SYM15* in roots colonization and arbuscule formation. **New Phytologist**, Oxford, v. 163, n.2, p. 381-392, Aug. 2004.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.C.; CAMPBELL, A .P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDOLV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030. Jun. 1996.

DOLL, J.; HAUSE, B.; DEMCHENKO, K.; PAWLOWSKI, K.; KRAJINSKI, F. A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 1208-1214. Nov 2003.

DONG, X.N. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 4, p. 316-323, Aug. 1998.

DOUDS, D.D.; JOHNSON, J.R.; KOCH, K.E. Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, n. 2, p.491-496, Feb. 1988.

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

ESQUERRE-TUGAYE, M.T.; BOUDART, G.; DUMAS, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 157-163, Jan./Feb. 2000.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signaling: rapid activation by WRKY transcription factors. **EMBO Journal**, New York, v.18, n. 17, p. 4689-4699, Sept. 1999.

FESTER, T.; HAUSE, G. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 15, n. 5, p. 373-379, Jul. 2005.

FINLAY, R.D. Mycorrhizal fungi and their multifuncional roles. **Mycologist**, New York, v.18, n.2, p.91-96, May. 2004.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. Cana-de-Açúcar. p. 370-378. 2006.

FRANQUEN, P.; REQUENA, N. Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. **New Phytologist**, Port Chester, v. 150, n. 3, p. 517-523, Jun. 2001.

GADKAR, V., DAVID-SCHWARTZ, R., KUNIK, T.; KAPULNIK, K. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, n.4, p. 1493-1499, Dec. 2001.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, OXFORD, v. 53, n. 373, p. 1377-1386, Jun. 2002.

GENRE, A.; BONFANTE, P. Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organization in the presence of a mycorrhizal fungus. **Protoplasma**, Vienna, v. 219, n. 1/2, p. 43-50, 2002.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1871-1883, Oct. 1996.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRECHENMACHER, L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic cell program. **Canadian Journal of Botany Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 82, n. 8, p. 1228-1234, Aug. 2004.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GRAHAM, J.H. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. chap. 6, p. 127-140.

GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T. ; MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, n. 3, p. 548-552, 1981.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomic: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 122-127, Apr. 2001.

GRIVET, L.; D'HONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J.C. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum spp.*): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, Baltimore, v. 142, n. 1, p. 987-1000, Mar. 1996.

GRUNWALD, I.; HEINIG, I.; THOLE, H.H.; NEUMANN, D.; KAHMANN, U.; KLOPPSTECH, K.; GAU, A.E. Purification and characterisation of a jacalin-related, coleoptile specific lectin from *Hordeum vulgare*. **Planta**, New York, v. 226, n. 1, p. 225-234, Jun. 2007.

GUIMIL, S.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; SESMA, A.; OSBOURN, A.; ROUX, C.; IONNIDIS, V.; OAKELEY, E.J.; DOCQUIER, M.; DESCOMBES, P.; BRIGGS, S.P.; PASZKOWSKI, U. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial

colonization. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 102, n. 22, p. 8066-8070. May. 2005.

HARDOIM, P.R. **Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas**. PA. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

HARRISON, M.J. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. **Plant Journal**, cidade, v. 9, n.4, p. 491-503, Apr. 1996.

_____.Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 361-389, 1999.

_____.Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 9-42, 2005.

HARRISON, M.J.; DEWBRE, G.R.; LIU, J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Cell**, Rockville, v. 14. n. 10, p. 2413-2429, Oct. 2002.

HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 3, p.1213-1220, Nov. 2002.

HAUSE, B.; MROSK, C.; ISAYENKOV, S., STRACK, D. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 101-110. Jan. 2007.

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 139-146, Jan. 2007.

HOARAU, J.Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A.M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J.C. ; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum spp*). I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, n. 1, p. 84-97, Jul. 2001,

HOHNJEC, N.; VIEWEG, M.E.; PUHLER, A.; BECKER, A.; KUSTER, H. Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 4, p. 1283-1301. Apr. 2005.

HUANG, X.Q.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Plainview, v. 9, .n.9, p. 868-877, Sep. 1999.

IMAIZUMI-ANRAKU, H.; TAKEDA, N.; CHARPENTIER, M.; PERRY, J.; MIWA, H.; UMEHARA, Y.; KOUCHI, H.; MURAKAMI, Y.; MULDER, L.; VICKERS, K.; PIKE, J.; DOWNIE, J.A.; WANG, T.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; TABATA, S.; YOSHIKAWA, M.;

MUROOKA, Y.; WU, G.J.; KAWAGUCHI, M.; KAWASAKI, S.; PARNISKE, M.; HAYASHI, M. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. **Nature**, London, v. 433, n. 7025, p. 527-531, Feb. 2005.

INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. INVAM. Disponível em: http://invam.caf.wvu.edu/collection/generalinfo/species_diversity.htm Acesso em: 08 dez. 2004.

ISAYENKOV, S.; MROSK, C.; STENZEL, I.; STRACK, D.; HAUSE, B. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, n. 3, p. 1401–1410, Nov. 2005.

ISHII, T.; SHRESTHA, Y.H.; MATSUMOTO, I.; KADOYA, K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 65, n. 3, p. 525-529, Dec. 1996.

JAKAB, G.; MANRIQUE, A.; ZIMMERLI, L.; METRAUX, J.P.; MAUCH-MANI, B. Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 2230-2239, Aug. 2003.

JANNOO, N.; GRIVET, L.; CHANTRET, N.; GARSMEUR, O.; GLASZMANN, J.C.; ARRUDA, P.; D'HONT, A. Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 574-585, May. 2007.

JAVOT, H.; PUMPLIN, N.; HARRISON, M.J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.30, n. 3, p. 310-322. Mar. 2007.

JIRAGE, D.; TOOTLE, T.L.; REUBER, T.L.; FROST, L.N.; FEYS, B.J.; PARKER, J.E.; AUSUBEL, F.M.; GLAZEBROOK, J. Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 96, n. 23, p. 13583-13588, Nov. 1999.

JORDA, L.; COEGO, A.; CONEJERO, V.; VERA, P. Genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 4, p. 2360-2365, Jan. 1999.

JOURNET, E. P.; EL-GACHTOULI, N.; VERNOUD, V.; de BILLY, F.; PICHON, M.; DEDIEU, A.; ARNOULD, C.; MORANDI, D.; BARKER, D.G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 14, p. 737-748, 2001.

KANAMORI, N.; MADSEN, L.H.; RADUTOIU, S.; FRANTESCU, M.; QUISTGAARD, E.M.H.; MIWA, H.; DOWNIE, J.A.; JAMES, E.K.; FELLE, H.H.; HAANING, L.L.; JENSEN, T.H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. A

nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 103, n. 2, p. 359-364, Jan. 2006.

KISTNER C.; WINZER T.; PITZSCHKE A.; MULDER L.; SATO S.; KANEKO T.; TABATA S.; SANDAL N.; STOUGAARD J.; WEBB J. K.; SZCZYGLOWSKI K.; PARNISKE M. Seven *Lotus japonicum* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v.17, n. 8, p. 2217-2229, Aug. 2005.

KOSUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D.G.; BECARD, G. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v.131, n.3, p. 952-962, Mar. 2003.

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 405-413, Jul./Aug. 2006.

_____. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K.; DOUDS JR. D.D., (Ed.). **Current advances in micorrhizae research** St. Paul: APS Press, 2000. p.45-59.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and β -1-3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, New York, v. 140, n. 1, p. 33-42, Sept. 1998.

_____. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 4, p. 533-540, 1995.

_____. Suppression of endochitinase, β -1-3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 6, n. 1, p. 75-83, Jan./Feb. 1993.

LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 160, n. 2, p. 421-428, Nov. 2003.

LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R.D.; KUYPER, T.W.; VAN BREEMEN, N. Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 16, n. 5, p. 248-254, May. 2001.

LAO, M.; ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; ACEVEDO, R.; RODRIGUEZ, E.; LEON, O.; SANTANA, I. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 6, p. 1103-1111, 2008.

LAPOPIN, L.; FRANKEN, P. Modification of plant gene expression. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, D. (Ed.). **Arbuscular mycorrhizas: molecular biology and physiology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.68-84.

LEON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen-peroxide stimulates salicylic-acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 4, p. 1673-1678, Aug. 1995.

LEVY J., BRES C., GEURTS R., CHALHOUB B., KULIKOVA O., DUC G., JOURNET E. P., ANE J. M., LAUBER E., BISSELING T., DENAIRE J., ROSENBERG C., DEBELLE F. A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. **Science**, Washington, v. 303, n. 5662, p. 1361-1364, Feb. 2004.

LIMMONGKON, A.; GIULIANI, C.; VALENTA, R.; MITTERMANN, I.; HEBERLE-BORS, E.; WILSON, C. MAP kinase phosphorylation of plant profiling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 324, n. 1, p. 382-386. Nov. 2004.

LIU, J.Y.; BLAYLOCK, L.A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C.D.; VANDENBOSCH, K.A.; HARRISON, M.J. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 9, p. 2016-2123, Sep. 2003.

LIU, J.Y.; MALDONADO-MENDOZA, I.; LOPEZ-MEYER, M.; CHEUNG, F.; TOWN, C.D.; HARRISON, M.J. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 529-544, May. 2007.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(-\Delta\Delta C_t)}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LU, Y.H.; DHONT, A.; WALKER, D.I.T.; RAO, P.S.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with rflp using single-copy maize nuclear probes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 78, n. 1-2, p. 7-18, 1994.

LUCHESSI, A.A. Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*). **Boletim Técnico ESALQ/CENA**, Piracicaba, v. 7, p. 533-540, 1995.

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

MALDONADO-MENDOZA, I.E.; DEWBRE, G.R.; VAN BUUREN, M.L.; VERSAW, W.K.; HARRISON, M.J. Methods to estimate the proportion of plant and fungal RNA in an arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza**, New York, v. 12, n. 2, p. 67-74, Apr. 2002.

MANTHEY, K.; KRAJINSKI, F.; HOHNJEC, N.; FIRNHABER, C.; PÜHLER, A.; PERLICK, A. M.; KÜSTER, H. Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collectin of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 17, n. 10, p. 1063-1077, Oct. 2004.

MARTIN-LAURENT, F.; VAN TUINEN, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S.; FRANKEN, P. Differential display analysis of RNA

accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 256, n. 1, p. 37-44, Sep. 1997.

MASSOUMOU, M.; VAN TUINEN, D.; CHATAGNIER, O.; ARNOULD, C.; BRECHENMACHER, L.; SANCHEZ, L.; SELIM, S.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Medicago truncatula gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. **Mycorrhiza**, New York, v.17, n. 3, p. 223-234, May. 2007.

MATHIEU, Y.; KURKDJIAN, A.; XIA, H.; GUERN, J.; KOLLER, A.; SPIRO, M.D.; ONEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. **Plant Journal**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 333-343. Nov. 1991;

MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.G. Hibridização em cana-de-açúcar. In: BOREM, A. **Hibridização artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 221-254.

MATUSOVA, R.; RANI, K.; VERSTAPPEN, F.W.A.; FRANSSEN, M.C.R.; BEALE, M.H.; BOUWMEESTER, H.J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v.139, n.2, p. 920-934, Oct. 2005.

MAUCHER, H.; HAUSE, B.; FEUSSNER, I.; PITZSCHKE, A.; MIERSCH, O.; ZIEGLER, J.; RYAN, C.A.; WASTERNAK, C. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 199-213, Jan. 2000.

McDOWELL, J.M.; DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 25, n. 2, p. 403-410, Feb. 2000.

MEDINA, M.J.H.; GAGNON, H.; PICHE, Y.; OCAMPO, J.A.; GARRIDO, J.M.G.; VIERHEILIG, H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. **Plant Science**, Clare, v. 164, n. 6, p. 993-998, Jun. 2003.

MENHAJ, A.R.; MISHRA, S.K.; BEZHANI, S.; KLOPPSTECH, K. Posttranscriptional control in the expression of the genes coding for high-light-regulated HL#2 proteins. **Planta**, New York, v. 209, n. 4, p 406-413, Oct. 1999.

MING, R.; LIU, S.C.; LIN, Y.R.; DA SILVA, J.; WILSON, W.; BRAGA, D.; VAN DEYNZE, A.; WENSLAFF, T.F.; WU, K.K.; MOORE, P.H.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; IRVINE, J.E.; PATERSON, A.H. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 150, n. 4, p. 1663-1682, Dec. 1998.

MOREIRA, F.M.S. ; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. v. 1. 729 p.

MORREEL, K.; RALPH, J.; LU, F.C.; GOEMINNE, G.; BUSSON, R.; HERDEWIJN, P.; GOEMAN, J.L.; VAN DER EYCKEN, J.; BOERJAN, W.; MESSENS, E. Phenolic profiling of

caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar reveals novel benzodioxane oligolignols. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 4, p. 4023-4036, Dec. 2004.

NAGAHASHI G., DOUDS D.D. Apressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. **New Phytologist**, New York, v. 136, n. 2, p. 299-304, Jun. 1997.

NAITO, Y.; FUJIE, M.; USAMI, S.; MUROOKA, Y.; YAMADA, T. The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesohizobium huakuii* subsp. regei. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 1087-1095. Nov. 2000.

NAVAZIO, L.; MOSCATIELLO, R.; GENRE, A.; NOVERO, M.; BALDAN, B.; BONFANTE, P.; MARIANI, P. A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 673-681, 2007.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

OLDROYD, G.E.D.; DOWNIE, J.A. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 7, p. 566-576, Jul. 2004.

ORGANIZAÇÃO DE PLANTADORES DE CANA DO ESTADO DE SÃO PAULO-ORPLANA. **Perfil**. Disponível em http://www.orplana.com.br/corpo_estatisticas_producao.asp.htm. Acesso em: 10 dez. 2004).

_____. **Perfil**. Disponível em http://www.orplana.com.br/corpo_estatisticas_producao.asp.htm.

v. 15, n.159, Maio. 2008. Acesso em: 25 jun. 2008)

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S.P. Rice phosphate transporters include evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13324-13329, Oct. 2002.

PIPERIDIS, A.; D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic in situ hybridisation (GISH). **Proceedings Of International Society Of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 2, p. 565-566, Sep. 2001.

POTTER E.; BEATOR J.; KLOPPSTECH K. The expression of mRNAs for light-stress proteins in barley: inverse relationship of mRNA levels of individual genes within the leaf gradient. **Planta**, New York, v. 199, n. 2, p. 314-320, Jun. 1996.

QING-CHAO, J.; HAI-TAO, D.; YOU-LIANG, P.; BAO-HAN, C.; JING, S.; YE, D.; CHENG-EN, D.; YONG-QI, F.; YI-CHUN, L.; YOU-ZHI, L.; DE-BAO, L. Application of cDNA array for studying the gene expression profile of mature appressoria of *Magnaporthe grisea*. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 8, n. 2, p.88-97, Feb. 2007.

QUEREJETA, J. I.; EGERTON-WARBURTON, L.M.; ALLEN, M.F. Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. **Oecologia**, New York, v. 134, n. 1, p.55-64, Jan. 2003.

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

RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSKA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEIM, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, London, v. 414, n. 6862, p. 462-466, Nov. 2001.

REGVAR, M.; GOGALA, N.; ZALAR, P. Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. **New Phytologist**, New York, v. 134, n. 4, p. 703-707, Dec. 1996.

REQUENA N., MANN P., HAMPP R., FRANKEN P. Early developmentally regulates genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: GmGIN1, a novel gene encoding a protein with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.244, n. 1/2, p. 129-139, Jul. 2002.

REYMOND, P.; KUNZ, B.; PAULPLETZER, K.; GRIMM, R.; ECKERSKORN, C.; FARMER, E.E. Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 12, p. 2265-2276, Dec. 1996.

RIELY, B.K.; LOUGNON, G.; ANE, J.M.; COOK, D.R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 208-216, Jan. 2007.

RINGLI, C. The role of extracellular LRR-extensin (LRX) proteins in cell wall formation. **Plant Biosystems**, Bologna, v. 139, n. 1, p. 32-35, Mar. 2005.

ROJAS-ANDRADE, R.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C.M.; FRIAS-HERNANDEZ, J.T.; DENDOOVEN, L.; OLALDE-PORTUGAL, V.; RAMOS-VALDIVIA, A.C. Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, n. 1, p. 49-52, Mar. 2003.

ROSLING, A.; LANDERWEET, R.; LINDHAL, B.D.; LARSSON, K.H.; KUYPER, T.W.; TAYLOR, A.F.S.; FINLAY, R.D. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol profile determined by morphotyping and genetic verification. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, n. 3, p. 775-783, Sep. 2003.

ROSLING, A.; LINDHAL, B.D.; TAYLOR, A.; FINLAY, R.D. Mycelial growth and substrate acidification of ectomycorrhizal fungi in response to different minerals. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 31-37, Jan. 2004.

SALZER, P.; BONANOMI, A.; BEYER, K.; VOGELI-LANGE, R.; AESCHBACKER, R.; LANGE, J.; WIEMKEN, A.; KIM, D.; COOK, D.; BOLLER, T. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 7, n. 7, p. 763-778, Jul. 2000.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.1, n.3, p. 231-2331, 1975.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655-11660, Oct. 2000.

SCHUSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 12, p.1413-1421, Dec. 2001.

SHI, C.; INGVARSDEN, C.; THUMMLER, F.; MELCHINGER, A.E.; WENZEL, G.; LUBBERSTEDT, T. Identification by suppression subtractive hybridization of genes that are differentially expressed between near-isogenic maize lines in association with sugarcane mosaic virus resistance. **Molecular Genetics And Genomics**, New York, v. 273, n. 6, p. 450-461, Jul. 2005.

SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; ONATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 430-436, Oct. 2002.

SIQUEIRA, J.O. **Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germtube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. 1983. 123 p. Thesis (Doctor in Soil Science) – University of Florida, Gainesville, 1983.

SIQUEIRA, J.O.; KLAUBERG-FILHO, O. Micorrizas arbusculares: a pesquisa brasileira em perspectiva. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS. 2000. v.1, p. 235-264.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜRMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, simbiose e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, cidade, v. 25, p. 12-21, Mar./Abr. 2002.

SKAMNIOTI, P.; HENDERSON, C.; ZHANG, Z.G.; ROBINSON, Z.; GURR, S.J. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul. v. 20, n. 5, p.568-580, May. 2007.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Growth and carbon economy of VA mycorrhizal plants. In: SMITH, S.E.; READ, D.J. (Ed.). **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1997. p.105-125,.

SREENIVASAN, T.V.; AHLOOWALIA, B.S.; HEINZ, D.J. Cytogenetics. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 143–210.

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

STUMPE, M.; CARSJENS, J.G.; STENZEL, I.; GOBEL, C.; LANG, I.; PAWLOWSKI, K.; HAUSE, B.; FEUSSNER, I. Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 7, p. 781-791, Apr. 2005.

SUO, Y.; LEUNG, D.W.M. Accumulation of extracellular pathogenesis-related proteins in rose leaves following inoculation of in vitro shoots with *Diplocarpon rosae*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, n. 2, p. 167-178, Mar. 2002.

TAKAHASHI, D. **Análise de seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. 2005. 117 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TAKEDA, N.; KISTNER, C.; KOSUTA, S.; WINZER, T.; PITZSCHKE, A.; GROTH, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; PARNISKE, M. Proteases in plant root symbiosis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 111-121, Jan. 2007.

THERIOT, J.A.; MITCHISON, T.J. The 3 faces of profilin. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 835-838, Dec. 1993.

TINKER, P.B.; DURALL, D.M.; JONES, M.D. Carbon use efficiency in mycorrhizas - theory and sample calculations. **New Phytologist**, New York, v. 128, n. 1, p. 115-122. Sep. 1994.

UEHLEIN, N.; FILESCHI, K.; ECKERT, M.; BIENERT, G.P.; BERTL, A.; KALDENHOFF, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. **Phytochemistry**, Oxford, v.68, n. 1, p. 122-129, Jan. 2007.

VEMURI, B.; SINGH, S.S. Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. **Cellular Signalling**, New York, v. 13, n. 6, p. 433-439, Jun. 2001.

VETTORE, A.L.; da SILVA, F.R.; KEMPER, E. L.; ARRUDA,P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v. 24, n. 1/4, p. 1-7, 2001.

VIERHEILIG, H.; PICHE, Y. Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. **Flavonoids In Cell Function**, New York, v. 505, p. 23-39, 2002.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A .P; WYSS, U. Ink and vinegar, a simple staining for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 5004-5007, Dec. 1998.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; LANGE, J.; GUTRELLA, M.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis related proteins by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 8, p. 3031-3034, Aug. 1995.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E.M.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 559-569, Feb. 2006.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D.A.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 4, p. 1449-1454, Aug. 1995.

WALTER, M.H.; HANS, J.; STRACK, D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 243-254, Aug. 2002.

WANG, K.L.C.; YOSHIDA, H.; LURIN, C.; ECKER, J.R. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. **Nature**, London, v. 428, n. 6986, p. 945-950, Apr. 2004.

WEGEL, E.; SCHAUSEN, L.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; PARNISKE, M. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 11, n. 9, p. 933-966, Sep. 1998.

WOO, E.J.; DUNWELL, J.M.; GOODENOUGH, P.W.; MARVIER, A.C.; PICKERSGILL, R.W. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. **Nature Structural Biology**, New York, v. 7, n. 11, p. 1036-1040, Nov. 2000.

WOODGER, F.J.; JACOBSEN, J.V.; GUBLER, F. GMPOZ, a BTB/POZ domain nuclear protein, is a regulator of hormone responsive gene expression in barley aleurone. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 945-950, Jul. 2004.

WULF, A.; MANTHEY, K.; DOLL, J.; PERLICK, A.M.; LINKE, B.; BEKEL, T.; MEYER, F.; FRENKEN, P.; KUSTER, H.; KRAJINSKI, F. Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 16, n. 4, p. 306-314, Apr. 2003.

XIE, D.X.; FEYS, B.F.; JAMES, S.; NIETO-ROSTRO, M.; TURNER, J.G. COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science**, New York, v. 280, n. 5366, p. 1091-1094, May. 1998.

YOSHIDA, S.; PARNISKE, M. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v. 280, n. 10, p. 9203-9209, Mar. 2005.

YOUNG-PYO, L.; KIM, S.H.; BANG, J.W.; LEE, H.S.; KWAK, S.S.; KWON, S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 5, p. 591-598, May. 2007.

ZSÖGÖN, A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.D.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259-267, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A - Primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo. Para confirmar a expressão dos genes da biblioteca MS2

Gene	Anotação	Primers	Tamanho (fragmento)
SCESMS2001E09	SHR5-receptor-like kinase	5'- GGAATTCGATTAGCGTGGTC-3' 5'- ACCCAGAGGAGGAAATGCTT-3'	188 pb
SCESMS2001B08	dehydroascorbate reductase	5'- ATCCACACCACTGACAACGA-3' 5'- CAAAGCTCTTCCACCTCCAG-3'	248 pb
SCESMS2001F05	Remorin (pp34)	5'- GGGAGAACACAAGGAAAGCA-3' 5'- GCACCCGATGAGCTTCTTAG -3'	239 pb
SCESMS2001G05	legumain-like protease	5'-GGAATTCGATTAGCGTGGTC-3' 5'- ACAGCGGCTCAGGATACATT-3'	233 pb
SCESMS2003C08	Horcolin	5'- ACAAGGCAGTCCACTCCATC-3' 5'- TTATAACTCTCGGCGCATCA-3'	184 pb
SCESMS2003A03	Putative senescence-associated protein	5'- CGGGCAGGTACTAGGTTGAA -3' 5'- CGATGTCGGCTCTTCCTATC-3'	162 pb
SCESMS2001C04	putative glycine-rich protein	5'- GGAATTCGATTAGCGTGGTC -3' 5'- CGGACACACACGTCTCACTT -3'	199 pb
SCESMS2001C02	cysteine protease component of protease-inhibitor complex	5'- ACAGCTGATGATGGCATGAA-3' 5'- CCCGGGCAGGTACCTACTAT-3'	181 pb
SCESMS2001C11	Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP precursor	5'- GGGAGATTTCTTCGTTGCTG-3' 5'- AATCACCACCTCACGATCACG-3'	170 pb
TC48151	Actina	5'- GCCGTCCTCTCTCTGTATGC-3' 5'-CGAGCTTCTCCTTCATGTCC-3	238 pb

Apêndice B - Primers utilizados na reação de RT-PCR quantitativo. Para confirmar a expressão dos genes das membranas

Gene	Anotação	Primers	Tamanho (fragmento)
SCESMY2008E01	WALI7	5'-AGTCCACCAACTCCCTCCT-3' 5'-AGAAGCAACCTTGTGGGAAA-3'	160 pb
SCESMY3003C03	Quitinase tipo III	5'-GCCATGTTTCAGTGGAAGGAT-3' 5'-GTAGCGACCACAACCCTCAT-3'	153 pb
SCESMY3006H06	Catalase isoenzima 3	5'-GCCAAACATGTGAGTGATGG-3' 5'-ACGACGATGACAAGGAAAGG-3'	181 pb
SCESMY2008B05	Leaf senescence related protein-like	5'-CTCGTACATCTGGTGGCTCA-3' 5'-GAAGACTCTGGTTCGGTTGG-3'	202 pb
SCESMY2005D02	Precursor aspartic proteinase	5'-AGCTGGGAAATCAAATGGTG-3' 5'-ACTAGGAAGACGCTCGCAAA-3'	151 pb
SCESMY2005G03	COI1	5'-CCCACGTCCTTGCTTTCTTA-3' 5'-GAAGTGCAGGCGAAAATAGC-3'	166pb
SCESMY2003B05	Germin-like protein 4	5'-AGGTCGTCCACTCACTGAC-3' 5'-AGCCCGTCGAAGAAGAAGT-3'	210 pb
SCESMY2003B10	Glutathione transferase III (B)	5'-GAGTCGCACCACTTCTACCC-3' 5'-TACTTGTTGCTTGCGAGGTG-3'	161 pb
SCESMY2003E04	Urease accessory protein putative	5'-TCAGGACCACGAAAATCA-3' 5'-CTGATATGTCCAGCCCTTG-3'	187 pb
TC48151	Actina	5'-GCCGTCCTCTCTCTGTATGC-3' 5'-CGAGCTTCTCCTTCATGTCC-3'	238 pb