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

**Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma
peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**

Simão Lindoso de Souza

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

**Piracicaba
2006**

Simão Lindoso de Souza
Licenciado em Ciências Agrícolas

**Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase
apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**

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

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

**Piracicaba
2006**

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

Souza, Simão Lindoso de

Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular / Simão Lindoso de Souza. - - Piracicaba, 2006.

100 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Células 3. Micorriza 4. Peroxidase 5. Proteínas

I. Título

CDD 633.61

DEDICATÓRIA

Faço deste trabalho uma homenagem póstuma a meu pai Eduwirges Estêvão de Souza. Dedico também à minha mãe Maria Leonice Lindoso de Souza, meus irmãos e respectivos cônjuges: Iêda, Salomão & Eliza, Ione & George, e Patrícia. E ainda aos meus sobrinhos Sofia, Gabriel e André.

“Uma descoberta, seja feita por um menino na escola ou por um cientista trabalhando na fronteira do conhecimento, é em sua essência uma questão de reorganizar ou transformar evidências, de tal forma que se possa ir além delas assim reorganizadas, rumo a novas percepções.”

(Jerone Bruner)

.....eu sou o menino.

TWO D OR NOT TWO D??

"Tudo que move é sagrado."

Beto Guedes

AGRADECIMENTOS

Para se chegar a algum lugar, independente da distância a se percorrer, é preciso saber onde se está e onde se quer chegar, dar o primeiro passo. E em cada passo dado nessa nossa jornada encontramos pessoas que têm alguma importância, mesmo que não saibamos reconhecê-la de imediato. Não se caminha ou se chega a algum lugar sozinho. Gostaria de deixar registrado que seria impossível citar todas as pessoas que tiveram importância desde o início da minha formação profissional e pessoal, porém sei o quão importante foram e são para mim e espero poder agradecer, de alguma forma, a cada uma delas.

Grato a Deus pela vida e por tudo.

A Deus novamente, por conceder-me uma família a qual posso amar e ser fortalecido na reciprocidade do mesmo amor, por ser sempre tão incentivadora e entender minha ausência por tantos anos. A meu pai, Eduwirges Estêvão de Souza, por tudo que ensinou no seu curto período de vida (você está entre nós); à minha mãe, Maria Leonice Lindoso de Souza que, com o carinho de mãe e de pai, vive para os filhos (você é meu maior exemplo de força); aos meus irmãos: Iêda, Salomão, Ione e Patrícia, pela cumplicidade de vida, por compartilharmos tudo o que temos, e pelo apoio incondicional. Amo todos vocês.

Ao Prof. Dr. Marcio Lambais, mentor deste trabalho, pela confiança depositada, orientação e oportunidade de trabalho.

Ao Dr. Francisco Adriano (Fran) pela orientação na Iniciação Científica e constante amizade.

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas dicas: Dr. José Pereira, Dr. Ricardo Azevedo e Dra. Marli Fiori.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (UENF) pela disposição em ajudar e confiança.

Ao Dr. Eugênio Ulian enquanto estive no Centro de Tecnologia Canavieira por sua constante ajuda e fornecimento das mudas de cana-de-açúcar.

Aos colegas de laboratório, pelos momentos de trabalho e descontração: Adriano Lucheta, Carolina Maluche, Dra. Daniele Takahashi, Dra. Denise Santos, Dr. Eduardo Dutra, Gisele Nunes, Gisele “uai”, Dr. Juliano Cury, Karina Cenciani, Lucas Azevedo, Márcio Moraes, Pablo Hardoim, Dr. José Pereira, Rafael Dutra, Renato Magni, Robinson Moresca, Soraya

Kiriachev, Wladimir e todos estagiários. Em especial à Dra. Daniele Takahashi pela cooperação, informações preciosas e amizade fortificada com o tempo.

Aos amigos de outros laboratórios pelas valiosas contribuições: Dani Takahashi, Raul Santin, Carlos Moldes, Alessandro Riffel, Agustín Zsögön, Daniel Zandonadi, Priscila Gratão. Em especial ao Raul, Alessandro e Dani por toda ajuda.

A todos os professores que contribuíram para minha formação desde o Ensino Fundamental. Em especial ao Prof. Dr. Murilo Melo pela amizade e orientação no Programa Pedagógico.

Aos funcionários do Departamento de Solos com suas preciosas contribuições: Flávia, Martinha, Jack, Chico, Dorival, Moisés, Nancy, Nelson, Sérgio, Lico, Karina e Udson. Em especial aos técnicos Luis Fernando Baldesin e Denise L. C. Mescolotti por tantas ajudas durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate por ceder gentilmente seu laboratório para as análises de espectrometria de massas. Grato também à toda sua equipe de trabalho, em especial aos amigos Karem Xavier pela paciência, Paola Celedon e Alexander Andrade, a ajuda de vocês foi fundamental.

Ao Prof. Dr. Jorge Rezende pelo uso das dependências de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Ricardo Azevedo por colaborar, através de seus alunos, com todas as análises enzimáticas.

Ao Prof. Dr. Antônio Figueira por permitir o uso de seu laboratório contribuindo fortemente para a finalização deste trabalho. Obrigado à toda equipe pela paciência, em especial ao amigo Raul Santin.

Aos amigos de técnicas proteômicas Alexander Andrade, Flávia Capaldi, Karem Xavier, Paola Celedon e Vanderlei Stefanuto pelas trocas de experiências e constantes colaborações.

Aos amigos Mauro Guida, Alessandro Riffel, Dyeme Bento, Paulo de Tarso, Paulo Nazareno, Salim Jacaúna, José Wilson, Júlio Trindade pela agradável convivência do lar e aprendizado durante esses tempos. E também aos anexos Dênis e Pablo.

À moçada do melhor time que já joguei, o Tabajara: Luiz Fernando (Penha) e sua esposa Patrícia Libardi, Paulo Nazareno (Tobias), Alessandro Riffel (Gaúcho), Dyeme Bento & Sílvia, Paulo de Tarso (Johnny boy), Luciano Pacelli, Leonardo Cavalcanti (Léo), Leonardo

Martinelli (Lê), Lucílio Alves, Luis Timm, Julcemar Zilli (Xaxim), Jorge Henrique (Baiano), Winter Oliveira (Mineiro), Nelson Martinelli (Necão), Jorge Barbosa (Jorjão), Pablo Hardoim, Rogério Moura (Dom Juan), Salim Jacaúna (Barriga), Henrique Junqueira, Juliano Bragatto, Renato Salaroli (Maurício), Daniel Morizono, Guilherme Busi, entre tantos outros. Esse convívio foi muito bom, valeu mesmo moçada.

Aos amigos de longas datas e distâncias: Ana Dantas, Mauro Guida, Salomão Lima, Cidinha, Dirceu Macagnan e Daniela Macagnan, Lúcia e Lílían Pittol, Marinete Flores, Itamar Garcia, Edu Pedrasse, Eliziete Pereira, Raul Santin, Edlene Aquino, Cindy Moreira, Saulo Salaber, Daniela Mariano, Tairone Paiva, Marcelo Galdos, Jorge Henrique, Rui e Ana.

À minha amiga sempre especial Giuliana Castro Magalhães pela grandiosidade de espírito e por tudo que representa.

Aos meus “pais cariocas”: Sr. Amilton e D. Ângela pelo apoio constante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

Ao povo brasileiro, principalmente à massa trabalhadora e aos que não tiveram oportunidades de estudo, que no compromisso do pagamento de seus impostos, torna possível a Educação Formal de tantos outros brasileiros.

Como havia predito, várias pessoas estiveram envolvidas neste trabalho, não só de forma diretamente científica ou na labuta do trabalho, mas também muitas que contribuíram de forma significativa, cada uma ao seu modo e em seu momento, para que este trabalho obtivesse êxito.

Muito obrigado mesmo!!

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão Bibliográfica	15
2.1.1 Cana-de-açúcar	15
2.1.2 Micorrizas arbusculares.....	16
2.1.3 Controle das Micorrizas arbusculares pelo Fósforo	17
2.1.4 Proteômica no estudo de Micorrizas arbusculares	20
2.1.5 Proteínas de membranas	23
2.1.6 Sistema de defesa vegetal e proteínas antioxidantes	25
2.1.7 Peroxidases em MAs	26
2.2 Material e métodos	30
2.2.1 Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar	31
2.2.1.1 Instalação do experimento	31
2.2.1.2 Quantificação da colonização intrarradicular	32
2.2.1.3 Extração de proteínas de membrana plasmática.....	32
2.2.1.4 Extração do FI das raízes.....	33
2.2.1.5 Extração de proteínas totais de raízes.....	33
2.2.1.6 Quantificação de proteínas	34
2.2.1.7 Análise de proteínas por 2D PAGE.....	34
2.2.1.7.1 Focalização isoeletrica.....	34
2.2.1.7.2 SDS-PAGE	34
2.2.1.8 Coloração com prata.....	35
2.2.1.9 Coloração com coomassie blue	35
2.2.1.10 Aquisição das imagens	36
2.2.1.11 Digestão tripídica.....	36
2.2.1.12 Sequenciamento das proteínas.....	37

2.2.1.13 Análises das informações	37
2.2.2 Atividade de peroxidases no FI de raízes de cana-de-açúcar	37
2.2.2.1 Extração de proteínas para determinação da atividade de peroxidases	37
2.2.2.2 Atividade de Guaiacol Peroxidase.....	38
2.2.2.3 Atividade da Ascorbato Peroxidase.....	38
2.2.2.4 Atividade de Guaiacol Peroxidase em gel.....	38
2.2.3 Clonagem do gene codificante POX1 em raízes de cana-de-açúcar	39
2.2.3.1 Análise Filogenética de peroxidases	39
2.2.3.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	39
2.2.3.3 Extração de DNA genômico de folhas	40
2.2.3.4 Extração de RNA de raízes.....	40
2.2.3.5 Síntese da primeira fita de cDNA.....	41
2.2.3.6 Amplificação do DNA e cDNA por PCR.....	41
2.2.3.7 Clonagem dos fragmentos	42
2.2.3.8 Extração dos plasmídeos	42
2.2.3.9 sequenciamento utilizando “DYEnamic ET Terminator”	43
2.2.3.10 Análises das sequências.....	43
2.2.4 Análise da expressão do gene POX1	43
2.2.4.1 Amplificação dos fragmentos de cDNAs por qPCR	43
2.3 Resultados e discussões	44
2.3.1 Colonização micorrízica	44
2.3.2 Análise do proteoma da membrana plasmática de raízes	46
2.3.3 Análise do proteoma de raízes.....	50
2.3.4 Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes	56
2.3.5 Atividades de Guaiacol Peroxidases (GPX).....	63
2.3.6 Atividades de Ascorbato Peroxidases (APX).....	70
2.3.7 Extração de RNA e amplificação do DNA e cDNA por PCR.....	73
2.3.8 Análise da expressão do gene POX1 por qPCR	78
3 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular

Micorrizas arbusculares (MAs) são associações simbióticas entre os fungos do filo Glomeromycota e a maioria das plantas. Os mecanismos moleculares que controlam o processo de colonização e desenvolvimento das MAs são ainda pouco conhecidos, mas proteínas com acúmulo diferencial em MAs podem ter papel regulatório importante. O presente trabalho teve como objetivo detectar, por meio de eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas, proteínas com acúmulo diferencial no fluido intercelular (FI), membrana plasmática ou tecido radicular de cana-de-açúcar colonizada por *Glomus clarum*. Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas foram inoculadas com *G. clarum* e cultivadas com 20 ou 200 mg de P kg⁻¹ de substrato. Raízes micorrizadas e não-micorrizadas, 8 semanas após a inoculação, foram utilizadas para a extração de proteínas do FI, membrana plasmática e tecido radicular (solúveis totais). As proteínas foram separadas por 2D-PAGE e analisadas por espectrometria de massas. Os perfis de proteínas solúveis totais e de membrana plasmática não revelaram proteínas relacionadas à simbiose. No entanto, três proteínas do FI, uma hidrolase aspártica putativa, uma histidina quinase putativa e uma peroxidase putativa apresentaram acúmulo induzido em raízes micorrizadas. As atividades de peroxidases nas raízes e apoplasto das raízes foram determinadas. A atividade de peroxidase apoplástica foi maior em raízes colonizadas e cultivadas em baixo teor de P, quando comparado com controles não-inoculados. Com base na sequência parcial de aminoácidos dessa peroxidase, um fragmento de seu gene (POX1) foi amplificado e clonado a partir de cDNA de raízes de cana-de-açúcar. A sequência obtida mostrou 90% e 91% de identidade com peroxidase de milho (NCBI) e cana-de-açúcar (TIGR), respectivamente. A análise de expressão de POX1 foi feita por PCR quantitativo a partir de transcritos extraídos de raízes micorrizadas e não-micorrizadas, em condições de baixo e alto P. O acúmulo de transcritos de POX1 em raízes micorrizadas em condições de baixo P foi 6,8 vezes maior do que em raízes micorrizadas cultivadas em condições de alto P. Raízes micorrizadas e cultivadas em condições de alto P apresentaram acúmulo de transcritos 3,9 vezes menor do que em raízes não-micorrizadas cultivadas nas mesmas condições de P. Os dados obtidos sugerem que o controle do metabolismo de espécies ativas de oxigênio é um dos fatores que contribuem para a regulação do desenvolvimento de MAs. Estudos com plantas alteradas para a expressão de POX1 são, no entanto, necessários para elucidar a essencialidade dessa peroxidase nas MAs.

Palavras-chave: Apoplasto; Cana-de-açúcar; Micorriza arbuscular; Peroxidase; Proteoma.

ABSTRACT

Analysis of the sugarcane roots proteome and expression of an arbuscular mycorrhiza-responsive apoplastic peroxidase

Arbuscular mycorrhizae (AM) are symbiotic associations between fungi of the phylum Glomeromycota and most of the plant species. Even though the molecular mechanisms controlling the colonization process and AM development are largely unknown, proteins with differential accumulation in AM may have important regulatory roles. The aim of this work was to detect, by bi-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and mass spectrometry, proteins with differential accumulation in the intercellular fluid (IF), plasma membrane or radicular tissue of sugarcane colonized by *Glomus clarum*. Micropropagated sugarcane plantlets were inoculated with *G. clarum* and growth under low or high P conditions, 20 or 200 mg P kg⁻¹ substrate, respectively. Mycorrhizal and non-mycorrhizal roots, eight weeks after inoculation, were used to extract proteins from the IF, plasma membrane and root tissue (total soluble proteins). Protein separation and analyses were performed using 2D-PAGE and mass spectrometry. The total soluble and plasma membrane protein profiles did not revealed symbiosis-related proteins. However, three proteins from the IF, a putative aspartic hydrolase, a putative histidine kinase and a putative peroxidase showed induced accumulation in mycorrhizal roots. Peroxidase activities in roots and apoplastic fluid were determined, and shown to be higher in mycorrhizal roots at low P than in non-mycorrhizal control roots. Based on the partial amino acid sequence of this peroxidase, a partial cDNA sequence of its gene (POX1) was cloned from PCR-amplified cDNA from sugarcane roots. The POX1 sequence showed 90% and 91% identity to maize (NCBI) and sugarcane (TIGR) peroxidase, respectively. Expression analyses of POX1 were performed using quantitative PCR of reverse transcripts from mycorrhizal and non-mycorrhizal roots at low and high P conditions. The steady state level of POX1 transcripts in mycorrhizal roots at low P condition was 6.8-fold higher than in mycorrhizal roots at high P conditions. In mycorrhizal roots at high P conditions the steady state level of POX1 transcripts was 3.9-fold lower than in non-mycorrhizal control roots. These data suggest that the metabolism of reactive oxygen species may be an important factor controlling the development of AM. Studies with plants altered in POX1 expression are, however, required to elucidate the essentiality of this peroxidase in AM.

Keywords: Apoplast; Sugarcane; Arbuscular mycorrhiza; Peroxidase; Proteome.

LISTA DE ABREVIATURAS

(v/v) – volume por volume
2D PAGE – two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis
2D-LC-MS/MS – eletroforese bidimensional seguida de cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem
ACN – acetonitrila
AF – ácido fórmico
APX – ascorbato peroxidase
BSA – albumina de soro bovino
CHAPS – chloroamidopropyl dimethylammonio propano sulfonate
DEPC – dietilpirocarbonato
DTT – ditioneitol
ESI – electrospray ionization
EST – expressed sequence tags
Fe-EDTA – ferro ácido etilenodiamino tetra-acético
FI – fluido intercelular
FMAs – fungos micorrízicos arbusculares
GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GFP – green fluorescent protein
GPX – guaiacol peroxidase
HPLC – high performance liquid chromatography
IAA – iodo acetamida
IPG – immobile pH gradient
kDa – quiloDaltons
MALDI – matrix assisted laser desorption ionization
MAs – micorrizas arbusculares
MS – espectrometria de massas
NL – não linear
PAGE – polyacrilamide gel electrophoresis
PCR – reação em cadeia da polimerase
pI – ponto isoelétrico
PM – peso molecular
PMSF – phenylmethanesulphonyl fluoride
PSA – persulfato de amônio
PVPP – polivinil polipirrolidona
qPCR – PCR quantitativo
Q-TOF – quadrupole-time of flight
RT-PCR – retro PCR
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis
TA – temperatura ambiente
TCA – ácido tricloroacético
TEMED – tetramethylethylenediamine
TOF – time of flight

1 INTRODUÇÃO

As Micorrizas Arbusculares (MAs) são associações simbióticas formadas entre fungos pertencentes ao filo Glomeromycota e raízes da maioria das plantas vasculares (HARRISON, 1999). Esta associação exerce enorme efeito sobre o desenvolvimento e fisiologia das plantas, aumentando seu crescimento e produção, em função do aumento da absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (P). A troca de nutrientes entre os simbiontes micorrízicos ocorre em estruturas fúngicas intrarradiculares conhecidas como arbúsculos, que são formadas pela intensa ramificação dicotômica das hifas e invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (HARRISON, 1999).

O estabelecimento e funcionamento da MA envolve um complexo processo de desenvolvimento, com concomitantes alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares em ambos simbiontes (DASSI, et al., 1999).

As moléculas e genes envolvidos, assim como suas respectivas funções na simbiose ainda precisam ser esclarecidas. Estudos de expressão de proteínas têm sido feitos em outros modelos de interação planta-microrganismo, e especialmente em associações mutualísticas entre rizóbios e leguminosas e em associações ectomicorrízicas (PUEPPKE, 1996; MARTIN et al, 1995). Em MAs, no entanto, as limitações sobre o conhecimento das biomoléculas envolvidas no estabelecimento da simbiose são maiores (WYSS et al, 1990; SAMRA et al, 1997). Uma das maiores limitações para se estudar os mecanismos moleculares que regulam as MAs é o fato de os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) serem simbiontes obrigatórios.

Muitas análises moleculares têm sido feitas, focalizando a alteração na expressão de proteínas durante os estágios iniciais do desenvolvimento de MAs. Análises eletroforéticas de proteínas totais extraídas de raízes de várias espécies de plantas colonizadas por FMAs têm mostrado diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis protéicos em comparação a raízes não-colonizadas (ARINES et al, 1993; SIMONEAU et al, 1994; DUMAS-GAUDOT et al, 1994; SAMRA et al, 1997; SOUZA, 2002). Esses estudos têm mostrado que a colonização micorrízica de sistemas radiculares resulta no aparecimento de novas proteínas, aumenta a produção de alguns polipeptídeos já presentes em raízes não infectadas e/ou diminui a quantidade de outros.

Os peptídeos que ocorrem exclusivamente em raízes colonizadas por FMAs e podem ter origem vegetal ou fúngica, são chamados de micorrizinas (VERMA et al, 1992). As micorrizinas compõem cerca de 4-5% do total de proteínas das MAs (GIOVANNETTI, et al., 1996). O papel

das micorrizas ainda é desconhecido, embora haja similaridades entre algumas delas com certas nodulinas induzidas durante a simbiose rizóbio-leguminosa (van RHIJN et al, 1997).

Evidências sugerem que, assim como em interações planta-patógeno, proteínas vegetais são liberadas para o espaço apoplástico como resposta de defesa da planta à infecção fúngica (SUO & LEUNG, 2002), e que a indução/supressão de mecanismos associados ao sistema de defesa vegetal desempenha um importante papel na colonização e compatibilidade fúngica entre os FMAs e seus hospedeiros (LAMBAIS & MEDHY, 1993; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002).

Também tem sido sugerido que proteínas de membranas podem estar envolvidas no controle da funcionalidade da simbiose, na comunicação entre os simbiossomas e controle da síntese dos simbiossomas (arbúsculos e membrana periarbuscular).

Assim, as técnicas de podem auxiliar na identificação e caracterização de proteínas com acúmulo diferencial em MAs. No entanto, o sucesso dessa abordagem depende da eficiente separação das proteínas por 2D-PAGE, para posterior caracterização por espectrometria de massas.

O objetivo deste trabalho foi detectar possíveis micorrizas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* condições de baixa e alta concentração de P, através de eletroforese bidimensional, espectrometria de massas Q-ToF. Além disso, determinar as variações nas atividades de peroxidases e acúmulo de transcritos de uma isoforma de peroxidase por PCR em tempo real.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é o principal produto agrícola do Estado de São Paulo, sendo o Brasil o maior produtor mundial dessa cultura. Atualmente, são aproximadamente 5,5 milhões de hectares plantados com produção de 423 milhões de toneladas de colmos na safra 2005/2006 (FNP Consultoria e Comércio, 2006). Sua importância sócio-econômica pode ser atribuída principalmente à produção de dois derivados: o açúcar utilizado na alimentação humana, e o etanol que substitui de forma mais econômica e menos poluente os derivados de petróleo utilizados como combustível de automotivos.

A recente preocupação com o aumento do aquecimento global levou os países a desenvolverem tecnologias alternativas que diminuíssem a emissão de gases poluentes. O Brasil, mesmo com a falência do Programa Nacional do Alcool (Pró-Alcool), criado na década de 1970, foi o pioneiro no desenvolvimento dessa tecnologia que permitiu a substituição em larga escala do combustível derivado do petróleo pelo etanol originado da cana-de-açúcar. O Pró-Alcool, no entanto, teve como resultados o aumento das áreas plantadas e desenvolvimento de programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar.

As variedades modernas de cana-de-açúcar foram obtidas através de cruzamentos entre espécies do gênero *Saccharum*, s são caracterizadas pela alta poliploidia e freqüente aneuploidia. Essa variação de ploidia torna os programas de melhoramento genético clássicos baseados em cruzamentos extremamente complexos (TAKAHASHI, 2005).

Com o intuito de compreender melhor o genoma da cana-de-açúcar, em 1998, a FAPESP financiou a criação do projeto SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag), gerando um banco de dados contendo 238.000 ESTs (Expressed Sequence Tags) provenientes de 26 bibliotecas de cDNAs, sintetizadas a partir de diversos órgãos e tecidos da cana-de-açúcar em diferentes estádios de desenvolvimento (ARRUDA, 2001).

Embora não seja um modelo vegetal ideal para estudos de MAs, a existência de um banco sequências expressas de cana-de-açúcar pode contribuir para melhor entender a fisiologia de interações simbióticas entre cana-de-açúcar e microrganismos.

Mesmo com a importância sócio-econômica da cana-de-açúcar, ainda é grande a escassez de estudos sobre MAs nessa espécie vegetal na literatura. Esse fato pode ser devido principalmente à baixa dependência micotrófica da cana-de-açúcar (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). Por ser uma gramínea de ciclo longo, os efeitos da inoculação com FMAs não podem ser avaliados em experimentos de curta duração em casa-de-vegetação, onde os fatores climáticos são controlados. Assim, dos poucos estudos de MAs em cana-de-açúcar, a maioria está relacionada à diversidade dos fungos na cultura sob diferentes sistemas de manejo.

Siqueira et al. (1989) estudaram vários agrossistemas em Minas Gerais e observaram que o solo sob cultivo de cana-de-açúcar foi o que apresentou maior diversidade de espécies de FMAs. Outro estudo de diversidade de FMAs, realizado por Reis et al. (1999) em canaviais localizados nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco, mostrou que a adoção da queima do palhicho nos canaviais por ocasião da colheita diminui o número de esporos no solo e a diversidade dos FMAs. Sugerindo que o manejo da cultura pode afetar a comunidade de FMAs. No entanto, o efeito dessa alteração na eficiência simbiótica não são conhecidos.

2.1.2 Micorrizas arbusculares

As raízes da maioria das plantas vasculares está sujeita a formar uma associação de caráter simbiótico com um grupo de fungos do solo pertencentes ao filo Glomeromycota (SCHÜßLER et al., 2001). Essas relações são conhecidas como micorrizas arbusculares (HARRISON, 1999) e são as associações simbióticas mutualísticas mais abundantes na natureza (BLILOU et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2002).

Uma das características marcantes dos FMAs é a ausência de especificidade hospedeira (HARRISON, 1999). Cerca de 160 espécies de FMAs são capazes de associar-se a mais de 80% das plantas vasculares na maioria dos ecossistemas (GINZBERG et al., 1998). Outra característica observada nos FMAs é o fato de serem simbiotróficos obrigatórios, ou seja, só são capazes de completar seu ciclo de vida se associados a uma planta hospedeira (SIQUEIRA et al., 2002).

O primeiro passo para o desenvolvimento da simbiose é o reconhecimento mútuo entre a planta e o fungo. A raiz libera moléculas sinais que estimulam a ramificação das hifas (BUÉE et al., 2000), e o fungo responde liberando um outro sinal que induz a ativação de genes específicos da simbiose na planta (CHABAUD et al., 2002; KOSUTA et al., 2003). O processo de infecção ocorre

a partir do contato de hifas com as raízes das plantas. Em seguida, eventos morfológicos e bioquímicos específicos, regulados por ambos simbioss e afetados por fatores abióticos, determinam o desenvolvimento da simbiose (LAMBAIS, 2006).

As MAs são caracterizadas pelo crescimento intercelular das hifas dos FMAs no tecido cortical das raízes, e pela diferenciação de hifas intracelulares terminais em estruturas efêmeras chamadas arbúsculos (BONFANTE-FASOLO, 1984), as quais são responsáveis pela troca bidirecional de nutrientes entre os simbioss (GIANINAZZI-PEARSON, 1996).

Esta simbiose confere benefícios ecológicos relevantes, pois os fungos promovem o aumento da absorção de diversos nutrientes, principalmente aqueles com baixa mobilidade na solução do solo, como P, Zn e Cu (EZETA & SANTOS, 1980; SILVEIRA, 1992). Outras vantagens das MAs são: maior tolerância a metais pesados (NOGUEIRA, 1996; SIQUEIRA et al., 1999), doenças (BODKER et al., 1998) e estresse hídrico (MARULANDA et al., 2003; PORCEL et al., 2004; RUIZ-LOZANO et al., 2001). A formação de MAs pode resultar também em aumentos da biomassa vegetal (KHALIQ & SANDERS, 1997).

Os mecanismos pelos quais estes efeitos são produzidos ainda estão longe de serem compreendidos, mas com o aprofundamento dos conhecimentos sobre a simbiose, eventualmente será possível a sua manipulação para melhorar os benefícios agrônômicos por ela conferidos.

2.1.3 Controle das Micorrizas Arbusculares pelo Fósforo

Dependendo da disponibilidade de P, a colonização das raízes pelos FMAs pode variar. Em geral, nas plantas com alto teor de P a colonização radicular é reduzida ou mesmo ausente, enquanto que baixos níveis de P estimulam a colonização. Os mecanismos exatos envolvidos nessa regulação ainda não são conhecidos, entretanto, em muitos trabalhos a diminuição da permeabilidade da membrana celular em plantas cultivadas em condições de alto teor de P, resultando num menor efluxo de aminoácidos e açúcares tem sido atribuído à menor colonização radicular (SMITH & READ, 1997).

Exudados de raízes de plantas cultivadas em baixo teor de P estimulam o crescimento e ramificação das hifas fúngicas (NAGAHASHI et al., 1996; VIERHEILIG et al., 1998) e a colonização radicular (PINIOR et al., 1999), enquanto que exudados radiculares de plantas cultivadas em alto teor de P suprimem o crescimento das hifas (TAWARAYA et al., 1996) e a colonização radicular (TAWARAYA et al., 1998).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o efeito do P no desenvolvimento de MAs. Fosfatases acumuladas nas raízes, em condições de alto nível de P, formariam dímeros com lectinas, as quais bloqueariam a penetração do fungo (WOOLHOUSE, 1975). Alternativamente, baixo suprimento de P reduziria a síntese de fosfolipídeos, tornando as células mais permeáveis, o que facilitaria a colonização da raiz (GRAHAM et al., 1981). Outra hipótese propõe que aumento da disponibilidade de P no solo, induziria o maior acúmulo de açúcares no tecido radicular e, estes açúcares teriam efeito inibitório sobre o crescimento de propágulos fúngicos (SIQUEIRA, 1983).

Transportadores de P expressos em hifas externas de *Glomus versiforme*, e transportadores de açúcares induzidos em raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *G. versiforme* já foram identificados e caracterizados (HARRISON E VAN BUUREN, 1995; HARRISON, 1996; LIU et al., 1998). Em raízes de milho colonizadas por *Glomus clarum* ou *Gigaspora margarita* foi observada a indução de pirofosfatases e ATPases presentes nas membranas microssomais. A ativação de ATPases durante a simbiose micorrízica está de acordo com a idéia de transporte bidirecional de metabólitos na interface simbiótica. Segundo Ramos et al. (2005), a intensa troca de metabólitos entre os simbiontes ativa as ATPases, gerando um déficit energético na célula que causaria a ativação das pirofosfatases.

Alguns estudos envolvendo a variação dos níveis de flavonóides em função da concentração de P na planta sugerem que estes desempenham um papel regulatório fundamental nos estágios iniciais da micorrização. A concentração de P nas plantas parece regular o acúmulo de flavonóides (VIERHEILIG, 2004). Em plantas de alfafa com altos níveis de P, após a inoculação com *G. intraradices*, foi verificada uma alta concentração de medicarpina, embora estruturas fúngicas não estivessem presentes no córtex radicular. Medicarpina apresenta um forte efeito inibitório na germinação de esporos e no crescimento de hifas de FMAs (GUENOUNE et al., 2001) e está presente em baixas concentrações em raízes micorrizadas em condições de baixo P. Estes pesquisadores sugeriram que a inibição da colonização de raízes de alfafa tratadas com alto teor de P é devido ao acúmulo de compostos inibitórios como a medicarpina.

Interessantemente, Larose et al., (2002) verificaram que em plantas de alfafa com baixo teor de P, sinais derivados do FMA *Glomus intraradices* são percebidos pela raiz antes da formação do apressório, alterando seu nível de flavonóides. Em condições de baixo P, dois compostos estimulatórios de desenvolvimento fúngico e/ou colonização foram encontrados em

altas concentrações raízes, enquanto que os níveis de formononetina e medicarpina foram reduzidos. Larose e seus colaboradores sugerem que uma vez que, uma vez nas proximidades da raiz, os FMAs produzem elicitores que modulam o metabolismo de flavonóides na planta para favorecer a colonização radicular.

Embora a essencialidade da presença de flavonóides para a formação micorrízica ainda não tenha sido comprovada, existem vários estudos envolvendo a participação desses compostos na interação do FMA com as plantas. Um papel para flavonóides durante a micorrização foi proposto por Akiyama et al. (2002). Em raízes de melão deficientes em P, o flavonóide isovitexina foi detectado, mas não em plantas de melão com alto teor de P. A aplicação desse flavonóide em plantas de melão inoculadas com FMAs aumentou a colonização radicular, demonstrando seu efeito estimulatório na colonização de raízes.

Em suma, dependendo do teor de P, as plantas possivelmente desenvolvem diferentes estratégias com flavonóides para regular a colonização radicular por FMAs (VIERHEILIG, 2004). Acúmulo de flavonóides em raízes é dependente do teor de P, o qual dita a exudação radicular. Plantas com alto teor de P, quando estimuladas com sinais derivados dos FMAs, podem acumular flavonóides inibitórios ao FMA, evitando assim o custo da simbiose sem o benefício nutricional, enquanto que em plantas deficientes de P, na ausência ou presença de sinais derivados dos FMAs, flavonóides podem ser acumulados para estimular a colonização micorrízica, melhorando assim a absorção de P pela planta (VIERHEILIG, 2004).

Mesmo com o limitado conhecimento sobre os aspectos moleculares da simbiose micorrízica, acredita-se que as plantas possuam mecanismos auto-regulatórios na formação da simbiose, onde a disponibilidade de P afeta diretamente o nível de infecção fúngica, garantindo assim, o benefício líquido da simbiose.

Lambais & Mehdy (1995) sugerem um modelo para explicar o mecanismo do controle da simbiose envolvendo o P, fitormônios e o sistema de defesa vegetal. Alterações no balanço hormonal causadas pela infecção fúngica, 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. Tem sido observado que o mecanismo de regulação das MAs pelo P pode envolver também a expressão diferencial de catalases, superóxido dismutases e peroxidases (LAMBALIS et al., 2003).

Devido ao possível efeito de proteínas de defesa vegetal no controle do crescimento intrarradicar de FMAs, estudos sobre a regulação dessas proteínas têm predominado nos últimos anos, com ênfase na via biossintética de fitoalexinas isoflavonóides, proteínas envolvidas no reforço da parede celular vegetal, e proteínas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular de fungos (LAMBAIS, 1996).

Neste sentido, Lambais (1996) divide em quatro grupos os genes envolvidos na defesa vegetal e modulados durante a formação de MAs: genes envolvidos na via biossintética d fitoalexinas isoflavonóides; genes codificando hidrolases com atividade antimicrobiana; genes codificando proteínas relacionadas à patogênese; e genes codificando proteínas envolvidas no aumento da rigidez da parede celular vegetal, dentre elas as peroxidases.

2.1.4 Proteômica no estudo de Micorrizas Arbusculares

Proteômica é uma área da ciência biológica que estuda o conjunto de proteínas sintetizadas por uma célula ou conjunto de células em um determinado estágio de desenvolvimento ou sob condições ambientais específicas.

A caracterização geral do proteoma com identificação do maior número possível de proteínas ou das proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras com características fenotípicas contrastantes é um dos procedimentos comumente adotados na proteômica. A separação das proteínas por eletroforese bidimensional é vantajosa na medida que confere uma visão global do proteoma de um determinado tecido ou célula e permite a pré-separação das proteínas por ponto isoeletrico (pI) e massa molecular (MM). Entretanto, há dificuldades associadas a essa técnica, como a difícil reprodutibilidade dos resultados de eletroforese, baixa resolução dos *spots* dependendo da MM e pI, baixa sensibilidade para detecção de proteínas de baixa concentração, e baixa representação de proteínas hidrofóbicas (CELEDÓN, 2006). Estas dificuldades técnicas vêm sendo superadas pelo uso de maior número de repetições de géis (RUBINFELD et al., 2003), cuidadosas análises de imagens dos géis (ROGERS et al., 2003), seleção de faixas de pI estreitas, que aumentam a resolução das proteínas (GÖRG et al., 1999), enriquecimento de frações de proteínas com bases em características químicas (CORTHALS et al., 200) e aplicação de protocolos específicos para recuperação de proteínas de baixa solubilidade (MÉCHIN et al., 2003).

O outro procedimento é a utilização da espectrometria de massas para identificação das proteínas através da comparação das massas e sequências dos peptídeos gerados após digestão enzimática com sequências de proteínas depositadas em bancos de dados públicos.

Para a identificação das proteínas, os programas basicamente interpretam os espectros de fragmentação das proteínas e convertem essas informações em massas de peptídeos ou sequências de aminoácidos dependendo dos recursos dos equipamentos utilizados (SHEVCHENKO et al., 2001). Os programas realizam digestões teóricas em proteínas depositadas em bancos de dados e comparam esses valores com os dados experimentais. As comparações entre informações teóricas e experimentais geram listas de proteínas com diferentes graus de homologia e são ordenadas de acordo com uma probabilidade estatística, determinada pelo método de cálculo do algoritmo e pelos parâmetros de tolerância definidos pelo pesquisador (CHAMRAD et al., 2003). Uma dificuldade de quase todos os programas reside na geração de peptídeos sem homologia com proteínas de bancos de dados, devido a alterações pós-tradução que acabam por alterar a massa e sequência dos peptídeos gerados (FRANK et al., 2005). Para contornar esses problemas foi desenvolvido o programa ProteinLynx, ele é capaz de simular essas modificações pós-tradução e aumentar a probabilidade de detectar homologia com proteínas já caracterizadas (DENNY et al., 2002).

De uma forma geral, esses programas se baseiam nas comparações de sequências de proteínas contidas nos bancos de dados e utilizam a alternativa de comparação de regiões codificadoras de bancos de sequências de etiquetas expressas (ESTs) ou de genomas expressos. Essa alternativa é mais eficaz nos estudos de proteínas, uma vez que sequências de nucleotídeos depositadas em bancos de dados podem conter regiões repetidas ou que não codificam proteínas.

O uso dos bancos de ESTs tem sido de grande importância nos estudos de proteomas, por aumentar a probabilidade de identificação de proteínas por espectrometria de massas. Embora o uso dos bancos de ESTs possibilite o aumento da taxa de identificação de proteínas, não tem sido observadas altas correlações qualitativas (ANDERSON & SEILHAMER, 1997) ou quantitativas (GYGI et al., 1999) entre o mRNA e as proteínas relacionadas extraídas de um mesmo tecido (DUMAS-GAUDOT et al., 2004). A ausência da correlação entre proteínas e transcritos pode ser atribuída à diferença entre suas estabilidades, seja pela taxa de síntese ou de degradação (CARGILE et al., 2004) nos diferentes estágios de desenvolvimento. Essa ausência de correlação também pode ser devida principalmente a dois mecanismos: modificação pós-transcrição, como

controle da taxa de tradução e turnover de proteínas; e modificação pós-tradução, incluindo mais de 200 tipos, dentre os quais os principais são glicosilação e fosforilação. Por isso, o conhecimento de onde, como e quando proteínas são expressas é essencial para o entendimento dos processos biológicos (BESTEL-CORRE et al., 2004).

Uma abordagem para entender o controle espacial e temporal da expressão gênica em MAs é a análise de perfis de proteínas em raízes micorrizadas. Essa abordagem foi amplamente utilizada na década passada (DUMAS-GAUDOT et al., 1994; SIMONEAU et al., 1994; SAMRA et al., 1997; BENABDELLAH et al., 1998; DASSI et al., 1999). Na maioria dos casos, entretanto, esses estudos não levaram a novas descobertas dos mecanismos de regulação das interações fungos-raízes. O avanço das técnicas de genômica de plantas modelo permitiram a geração de grande quantidade de ESTs de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por FMAs permitindo grandes avanços no entendimento da simbiose. Esses dados podem facilitar a análise de grandes quantidades de proteínas por técnicas de sequenciamento por espectrometria de massas (FESTER, et al., 2002). No entanto, uma quantidade limitada de informações sobre a interação de FMAs com gramíneas são disponíveis (OUERGHI et al., 2000).

Recentemente foi divulgado o proteoma do arroz (*Oryza sativa* L.) (AGRAWAL & RAKWAL, 2006), uma espécie aceita como modelo dentre as monocotiledôneas (GOFF, 1999). Através de diversas técnicas como eletroforese 2D, MS, sequenciamento de Edman e tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MultiPid), milhares de proteínas e seus genes foram identificados em várias cultivares de arroz utilizando órgãos reprodutivos, folhas, raízes, sementes e organelas (IMIN et al., 2004; AGRAWAL et al., 2002). Outros importantes cereais como o milho e o trigo também já tiveram o proteoma de diversos tecidos extensivamente analisados, inclusive após serem submetidos a estresses bióticos e abióticos (CHANG et al. 2000; MAJOUL et al., 2004).

A proteômica tem sido usada como uma poderosa ferramenta para revelar proteínas envolvidas na simbiose micorrízica (DUMAS-GAUDOT, et al., 2001; CÁNOVAS, et al., 2004). Bestel-Corre et al. (2002), numa análise temporal, compararam simbioses entre raízes de *Medicago truncatula* e *Glomus mosseae* ou *Sinorhizobium meliloti*. Não foram encontradas proteínas vegetais comuns induzidas por ambos simbiontes, embora esse resultado fosse esperado (CATOIRA, et al., 2000; BONFANTE et al., 2000; JOURNET et al., 2001; WERNER et al., 2002). Porém, algumas proteínas tiveram seu acúmulo alterado pela presença dos simbiontes e

foram identificadas por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Outras proteínas relacionadas à simbiose foram caracterizadas por espectrometria utilizando MALDI ToF (BESTEL-CORRE et al., 2003).

Neste sentido, análises de proteínas separadas por eletroforese bidimensional têm sido muito útil para revelar proteínas com acúmulo diferencial que poderiam estar envolvidas na formação de MAs. A combinação dessa técnica com a espectrometria de massas tem se mostrado útil na tentativa de identificar proteínas relacionadas à simbiose de raízes de *M. truncatula* com *Glomus mosseae* (BESTEL-CORRE et al., 2002). Porém todas as proteínas identificadas até o momento são de origem vegetal (DUMAS-GAUDOT et al., 2004). O insucesso para detectar proteínas fúngicas na fase simbiótica é provavelmente devido à sua baixa abundância em extratos de raízes micorrizadas, um fato que é corroborado pelo nível de RNA em raízes (LIU et al., 2003). Quando os proteomas a serem analisados consistem de milhares de proteínas, a resolução é limitada e somente as proteínas mais abundantes podem ser reveladas. De fato, há um consenso bem aceito de que a resolução na análise de proteomas pode ser aumentada através do fracionamento das proteínas, gerando “sub-proteomas”, dependendo do tipo de célula ou compartimento celular (van WIJK, 2001).

2.1.5 Proteínas de membranas

O desenvolvimento das MAs é definido por uma série de eventos morfogênicos desde a formação do apressório na superfície da raiz, a proliferação do micélio fúngico no tecido cortical das raízes e diferenciação de hifas terminais em estruturas efêmeras chamadas arbúsculos (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Nos arbúsculos, as hifas estão completamente envolvidas por membrana plasmática de origem vegetal chamada membrana periarbuscular. O conjunto de membranas vegetais, fúngicas e das interfaces entre elas nos arbúsculos é chamado de simbiossomo (HARRISON, 1999).

Os arbúsculos são os principais locais de transferência de nutrientes e fotossintatos entre os dois simbiontes. Fósforo e Nitrogênio são os principais macronutrientes absorvidos pelos FMAs e translocados para as plantas (SMITH & READ, 1997; SUBRAMANIAN & CHAREST, 1999).

A localização de transcritos codificando transportadores de fosfato em *Lycopersicon esculentum* e *Solanum tuberosum* mostraram que os genes correspondentes foram altamente

expressos em células contendo arbúsculos (ROSEWARNE et al., 1999; RAUSCH et al., 2001). Em *Medicago truncatula*, genes codificando transportadores de fosfato foram detectadas em arbúsculos (HARRISON et al., 2002).

Investigando o transporte ativo de nutrientes no arbúsculo, Gianinazzi-Pearson et al. (1991) observaram alta atividade de H^+ -ATPase tanto na membrana periarbuscular de alho como na membrana plasmática de *Glomus intraradices*, as quais poderiam gerar a força motriz necessária para a absorção e efluxo de solutos pela interface planta-fungo (PORTILLO, 2000). Recentemente, a expressão de genes codificando H^+ -ATPase de *Nicotiana tabacum* e *Medicago truncatula* foi observada especificamente em células contendo arbúsculos (GIANINAZZI-PEARSON et al., 2000; KRAJINSKI et al., 2002). Altos níveis de expressão de dois genes codificando H^+ -ATPases de *Glomus mosseae* também foram detectados durante o desenvolvimento intrarradicular (REQUENA et al., 2003). Embora poucas proteínas intrínsecas de membrana envolvidas no transporte de nutrientes tenham sido investigadas por técnicas moleculares, o conhecimento sobre outras proteínas putativas de membranas reguladas durante a simbiose micorrízica continua limitado (VALOT et al., 2006).

Recentemente, técnicas de proteômica, envolvendo eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e bioinformática, têm sido utilizadas de forma eficiente para monitorar a regulação de proteínas em interações planta-microrganismos (MATHESIUS et al., 2003; ROLFE et al., 2003; BESTEL-CORRE et al., 2004; CÁNOVAS et al., 2004; VALOT et al., 2005).

Estudos de proteínas de membranas expressas em resposta à micorrização podem fornecer informações relevantes para o entendimento da troca de nutrientes e/ou comunicação entre os simbiontes. Alterações nos perfis de polipeptídeos de membranas durante o desenvolvimento da MA foram registrados (BENABDELLAH et al., 1998, 2000). Entretanto, somente uma proteína correspondente a uma subunidade de H^+ -ATPase vacuolar de planta pôde ser identificada por sequenciamento da região N-terminal (BENABDELLAH et al., 2000). Protocolos de otimização da extração microssomal aliado à utilização da espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática têm aumentado o sucesso na identificação de proteínas de membrana relacionadas à micorrização em *Medicago truncatula* (VALOT et al., 2004).

2.1.6 Sistema de defesa vegetal e proteínas antioxidantes

Proteínas presentes no apoplasto e/ou ancoradas na parede celular são as primeiras barreiras naturais encontradas por microrganismos ao infectarem plantas. As proteínas de parede podem ser classificadas dentro de quatro categorias funcionais principais: relacionadas à estrutura da parede celular, remodelamento, sinalização e defesa vegetal. Através de conjugação com outras moléculas, como açúcares e outras proteínas, as proteínas de parede podem estar envolvidas em complexos macromoleculares com estrutura, função e propriedades físico-químicas ainda a serem descobertas, mas que poderiam ter importante participação no controle da simbiose (BOUDART et al., 2005).

Em interações planta-patógeno inúmeros mecanismos de defesa são ativados em resposta à infecção microbiana. Existem relatos sobre respostas de defesa durante a penetração de FMAs nas raízes, o crescimento intrarradicular e a formação dos arbúsculos (HARRISON, 1999; GARCÍA-GARRIDO & OCAMPO, 2002; LAMBAIS, 2006).

Os FMAs possuem muitas das moléculas presentes na parede celular de fungos fitopatogênicos, incluindo quitina e glucanas, cujos oligômeros podem agir como elicitores de respostas de defesa na planta (BOLLER, 1995). Se os FMAs possuem essas moléculas, como eles evitam a ativação das respostas de defesa da planta? Uma possibilidade é que as moléculas que agem como os modelos moleculares associados a patógenos fúngicos são sutilmente diferentes em FMAs (HARRISON, 2005). Alternativamente, FMAs devem induzir alterações nas células do hospedeiro que levam à quebra da molécula elicitora, como acontece com quitinases secretadas por pinos (*Picea abies*) e agem em moléculas de quitina liberada pela parede celular de um fungo ectomicorrízico, clivando-as a tamanhos que as inativam e tornam incapazes de induzirem respostas de defesa (SALZER et al., 1997).

Tem sido proposto que proteínas específicas relacionadas a defesa possam estar envolvidas no controle do crescimento de FMAs no córtex das raízes (LAMBAIS & MEDHY, 1993). Em interações planta-patógeno incompatíveis, fitoalexinas acumulam no sítio de infecção durante a resposta de hipersensibilidade (RH). Sintomas semelhantes têm sido verificados o desenvolvimento de MAs, exceto em algumas plantas não hospedeiras (PARRA-GARCIA et al., 1992). A falta da RH após o reconhecimento do FMA pode indicar a não ativação, baixo nível de resposta ou mesmo a supressão do sistema de defesa da planta. Existem pelo menos duas hipóteses para explicar a atenuação das respostas de defesa das plantas em MAs: a) a degradação das

moléculas elicitoras produzidas pelos FMAs, e b) o bloqueio das vias de transdução de sinais após o reconhecimento das moléculas elicitoras.

A atenuação das respostas de defesa da planta pode ser ativada através do bloqueio das vias de transdução de sinais. Em interações planta-patógeno incompatíveis, o desenvolvimento da RH é acompanhado pelo aumento da concentração de espécies ativas de Oxigênio (EAOs) (Medhy, 1994). Dentre as EAOs, H_2O_2 tem sido considerado como um segundo mensageiro nas vias de transdução de sinais, permitindo a ativação dos genes relacionados à defesa (DANGL, et al., 1996).

As peroxidases são enzimas envolvidas na destoxificação do H_2O_2 e ainda catalisam a polimerização oxidativa de fenilpropanóis para produção de lignina, contribuindo para o enrijecimento da parede celular durante a infecção fúngica. Expressão diferencial de genes codificando peroxidases específicas em raízes micorrizadas tem sido documentada (DIXON & HARRISON, 1990; SPANU & BONFANTE-FASOLO, 1988). Atividade de peroxidase também pode ser afetada pela concentração de P e isoflavonóides (FRIES et al., 1998).

2.1.7 Peroxidases em MAs

Peroxidases são heme-proteínas que usam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como receptor final de elétrons para catalisar reações oxidativas. Heme peroxidases incluem duas superfamílias: uma encontrada em bactérias, fungos, plantas e a segunda encontrada em animais. A primeira é constituída de três classes principais: classe I, peroxidases intracelulares, incluindo: peroxidase citocromo c de leveduras, uma proteína solúvel encontrada na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, onde provavelmente serve de proteção contra peróxidos tóxicos; ascorbato peroxidase, a principal enzima responsável pela remoção do H_2O_2 do cloroplasto e citossol das plantas superiores; e as catalases peroxidases que conferem proteção às células sob estresse oxidativo. A classe II é constituída de peroxidases fúngicas secretadas: ligninases ou lignina-peroxidases e peroxidases dependentes de manganês. Estas são glicoproteínas monoméricas envolvidas na degradação de lignina. A classe III consiste de peroxidases que são secretadas para o apoplasto ou transportadas para dentro de vacúolos e que desempenham várias funções como: remoção do H_2O_2 dos cloroplastos e citossol, oxidação dos compostos tóxicos, biossíntese da parede celular, respostas de defesas contra injúrias mecânicas, defesa contra infecção de fitopatógenos, catabolismo do ácido-indol-acético, biossíntese do etileno, dentre outras. Proteínas

da classe III são glicoproteínas monoméricas contendo quatro pontes dissulfeto conservadas e dois íons cálcio, com massa molecular variando de 28 a 60 kDa. Existem como isoenzimas com sequências variáveis de aminoácidos em diferentes espécies de plantas (HIRAGA, et al., 2001; NIELSEN et al., 2001).

As peroxidases participam de vários processos metabólicos essenciais incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERGET al., 1986), lignificação, oxidação de fenóis, proteção contra estresses bióticos e abióticos, incluindo defesa contra ataques de patógenos (GRISEBACH, 1981).

Os níveis de estresse oxidativo celular são determinados pela concentração de EAOs. A destruição eficiente dessas EAOs requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia. Os principais mecanismos de limpeza das EAOs incluem as peroxidases, as quais são metabolizam diretamente o H_2O_2 , particularmente aquelas da parede celular (POLIDOROS & SCANDALIOS, 1999).

A guaiacol peroxidase é uma enzima que participa em reações metabólicas como a biossíntese de lignina, decomposição do ácido indol acético (AIA) e defesa contra patógenos. O ciclo catalítico da peroxidase é um mecanismo peroxidase ping-pong. Na conversão do H_2O_2 em H_2O um intermediário e dois elétrons oxidado é formado. Esses intermediários oxidam o ascorbato até a formação do composto mais reduzido (ASADA, 1999).

Geralmente peroxidases reagem com compostos contendo grupo(s) hidroxila ligado(s) a um anel aromático. Guaiacol (o-metoxi fenol) é comumente usado como substrato para medir a atividade das peroxidase (HIRAGA et al ., 2001). Muitas isoenzimas de guaiacol peroxidase ocorrem em tecidos de plantas e podem estar localizadas no vacúolo, parede celular e citossol, mas não são encontradas em organelas celulares como cloroplastos (NAKANO & ASADA, 1981). Tem sido sugerido que peroxidases ligadas à parede celular estão envolvidas no passo final do processo de lignificação e têm uma especial afinidade por siringaldazina, um substrato usado até então para testes histoquímicos (GOLDEBERG et al, 1983). A afinidade desta enzima pela siringaldazina é de 100 a 1000 vezes maior do que a afinidade pelo guaiacol (BENATTI, 2004).

Vários microrganismos fitopatogênicos e mutualísticos, em algum momento do processo de infecção, invadem o apoplasto da planta hospedeira. Em muitas espécies de plantas os produtos de vários genes induzidos durante as respostas de defesa são secretados para o apoplasto,

incluindo quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, como também numerosas proteínas relacionadas à patogênese de funções ainda desconhecidas (LAMBAIS, 1999).

O aumento da atividade de enzimas relacionadas à defesa vegetal durante a fase inicial da colonização intrarradicular por FMAs é acompanhado do aumento no nível de seus transcritos indicando a ativação dos mecanismos de defesa (LAMBAIS & MEDHY, 1998). No entanto, essa ativação é transiente e é normalmente, seguida de supressão em relação aos controles não micorrizados.

Durante interação patogênica, as plantas têm a capacidade de responder com uma série de reações de defesa que incluem aumento da atividade de muitas peroxidases. No caso das MAs, a questão é se os simbiossiontes influenciam a expressão e atividade de peroxidases de forma semelhante à infecção por patógenos. Considerando que em interações simbióticas, os mecanismos de defesa têm que ser controlados e limitados para permitir a associação de ambos organismos (GRAHAM, 2001).

Spanu & Bonfante-Fasolo (1998) observaram que a inoculação em raízes de alho poró com *Glomus versiforme* resultou em indução da atividade de peroxidase nas etapas iniciais da colonização micorrízica, quando comparadas com plantas controle não-inoculadas. A localização ultraestrutural da peroxidase revelou um acúmulo na lamela média de células com hifa intercelular em processo de penetração, enquanto que não foi observada atividade de peroxidase na parede de células corticais contendo estruturas fúngicas intracelulares (SPANU & BONFANTE-FASOLO, 1998).

Fries et al. (1996) encontraram resultados semelhantes na interação de milho com *G. intraradices*. McArthur & Knowles (1993) estudando o padrão de atividade de peroxidases em raízes de batata, em solos com baixa e alta concentração de P, observaram diminuição da atividade de peroxidases em raízes cultivadas sob baixa concentração de P e simultâneo aumento da atividade em função do aumento do nível de P no solo. McArthur & Vyas (1995) avaliaram a interação de juá com *G. fasciculatum* e também observaram aumento das atividades de peroxidases em resposta ao incremento de P disponível para as plantas e à indução de isoformas vegetais específicas em resposta à inoculação.

Além da mudança na atividade de peroxidases, a interação micorrízica pode também regular isoformas específicas. Mudanças no perfil de peroxidases radiculares seguidos de

colonização micorrízica foram observadas indicando uma expressão diferencial de isoenzimas específicas em raízes (MÜNZENBERGER et al. 1997; TIMONEN & SEN 1998).

A atividade de peroxidases em MAs tem sido bem estudada devido esta enzima servir como barreira protetora da planta contra a invasão fúngica no tecido vegetal. Spanu & Bonfante-Fasolo (1988) avaliaram atividade de peroxidases em paredes celulares de plantas de alho colonizadas por *Glomus versiforme*. Foi observado que os picos máximos de atividade ocorreram no início do estabelecimento simbiótico, embora nos estágios mais avançados a atividade tenha decrescido ao mesmo nível de plantas não micorrizadas.

Lambais et al. (2003) avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, peroxidase e superóxido dismutase) em raízes de feijão micorrizadas, numa escala temporal. Os autores observaram que, no início da micorrização, as atividades enzimáticas foram maior em raízes micorrizadas. A atividade específica de peroxidase em raízes micorrizadas, após 10 semanas de inoculação, foi menor que em raízes controle não-micorrizadas. Esse comportamento não foi verificado na atividade de catalase e superóxido dismutase que foi aumentada em condições de baixo teor de P e atenuada em alto teor de P.

Todavia, alguns resultados contraditórios têm sido registrados. Em raízes de *Medicago sativa* L. colonizadas por *Glomus mosseae*, foi observado aumento do nível de peroxidase após o estabelecimento da simbiose (CRIQUET et al., 2000; DEHNE & SCHÖNBECK, 1978).

Magalhães (2002) estudou a atividade de três enzimas, dentre elas a peroxidase, em plantas de soja associadas a FMAs do gênero *Glomus*, submetidas a dois níveis de P e a estresse com Mn. Esse estudo mostrou uma tendência do aumento da atividade de peroxidase em plantas inoculadas com FMAs e cultivadas em baixo teor de P. Porém, a justificativa para tal aumento da atividade de peroxidase foi que a condição de escassez de P aliada à possibilidade da efetivação incompleta da colonização, devido ao pouco tempo para o estabelecimento da simbiose, provocasse uma condição nutritiva adversa para a planta, somada à possibilidade de o fungo estar funcionando como dreno de C.

Criquet et al. (2000) analisaram outro agente estressante, o antraceno e dos FMAs na atividade de oxirredutases em raízes de *Medicago sativa* L. e concluíram que peroxidases são as enzimas dominantes nas raízes e sua atividade foi estimulada pela presença de micorrizas e/ou antraceno. A peroxidase-DAF (2,7-diaminofluorene) apresentou maior atividade em plantas micorrizadas com relação a plantas não-micorrizadas. Já a guaiacol peroxidase não apresentou

variações de atividade significativas entre plantas micorrizadas e não micorrizadas. Mathur & Vyas (1995) estudaram as mudanças isoenzimáticas de peroxidase em raízes de espécies de *Ziziphus* inoculadas com *G. fasciculatum* e verificaram que a atividade desta enzima foi maior nas plantas micorrizadas e que essas isoenzimas eram detectadas em raízes micorrizadas, quando comparadas com raízes controle não-micorrizadas.

A expressão de peroxidases em raízes de hospedeiras deve de alguma forma regular o crescimento do simbiote. Durante a fase inicial de infecção, pode haver produção de espécies ativas de oxigênio, o que pode deixar as paredes celulares mais maleáveis e facilitar a penetração do fungo. Durante o processo de colonização e desenvolvimento da simbiose é também possível que peroxidases relacionadas à defesa sejam expressas para limitar a expansão fúngica, mas também proteger a planta contra patógenos da microbiota do solo, através do estabelecimento de um ambiente altamente tóxico pela produção de espécies ativas de oxigênio.

A análise da expressão gênica em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum*, em condições de baixo e alto teor de P revelou a indução de 1,4 vezes da expressão de uma peroxidase durante a micorrização em condições de baixo teor de P, quando comparadas a plantas não colonizadas (TAKAHASHI, 2005).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar

2.2.1.1 Instalação do experimento

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (var. SP 80-3280) foram plantadas em bandejas de isopor de 200 células, cobertas com plástico transparente e aclimatadas por um período de dez dias em casa-de-vegetação, tendo como substrato areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v:v), previamente esterilizado.

Após este período as mudas foram transplantadas para vasos contendo 1 kg do mesmo substrato nas bandejas de isopor, adubadas com solução contendo: 240 mg de N (parcelado em três aplicações), 300 mg de K, 120 mg de Ca, 60 mg de Mg, 1 mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1 mL de solução de micronutrientes de Hoagland por vaso. O fósforo foi aplicado em duas concentrações: 20 e 200 mg de P kg⁻¹ de substrato. No transplântio, as mudas foram inoculadas com solo contendo esporos, hifas e fragmentos de raízes de *Brachiaria decumbens* previamente colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus clarum*. O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Solos da Esalq-USP, a 28°C. Tomou-se a precaução de realizar regas com água destilada, sempre que necessário, em quantidade suficiente para manter a umidade do substrato em aproximadamente 70% da capacidade de campo.

Quatro, seis e oito semanas após o transplântio, as plantas foram colhidas para análise da taxa de colonização do sistema radicular, extração de proteínas e RNA. Para análise estatística dos dados obtidos deste experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado num esquema fatorial 2x2x3, sendo dois níveis do fator P (alto e baixo), dois níveis do fator inoculação (*G. clarum* e controle não-inoculado), três níveis do fator tempo de colheita (quatro, seis e oito semanas após inoculação) com quatro repetições, totalizando 48 parcelas.

Dois outros experimentos foram colhidos 8 semanas após o transplântio. Esses dois experimentos foram realizados para análise da taxa de colonização do sistema radicular, extração de proteínas do FI, proteínas de membrana plasmática e proteínas solúveis totais das raízes. Para tanto, foram conduzidos dois ensaios em função da diferença na metodologia utilizada para extração de proteínas do FI e proteínas de membrana plasmática. Utilizou-se para análise estatística dos dados obtidos o delineamento experimental inteiramente casualizado num esquema

fatorial 2x2, sendo dois níveis do fator P (alto e baixo), dois níveis do fator inoculação (*G. clarum* e controle não-inoculado), com vinte repetições, totalizando 80 parcelas, cada ensaio experimental.

2.2.1.2 Quantificação da colonização intrarradicular

As raízes foram separadas das plantas e lavadas em água corrente. Subamostras do terço médio do sistema radicular foram coletadas e armazenadas em álcool 70% (v/v). O conteúdo citoplasmático foi removido pelo tratamento com KOH 10% (m/v) por 60 min a 90°C, e as raízes foram coradas com tinta de caneta (Parker) 5%(v/v) diluída em solução de ácido acético 5% (v/v) por 3 min a 90°C, lavadas em ácido acético 5% (v/v) para interromper a reação e remover o excesso de tinta. Em seguida foram armazenadas em solução de lacto-glicerol (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 & Mosse (1980).

2.2.1.3 Extração de proteínas da membrana plasmática

A extração de proteínas da membrana plasmática foi feita com gradiente de sacarose, utilizando a metodologia descrita por Benabdellah et al.(1998). Inicialmente, as raízes das plantas foram colhidas, lavadas e conservadas a -80 °C. Em seguida, foram maceradas com nitrogênio líquido e dissolvidas em solução de extração, contendo sacarose 250 mM, glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e DTT 1 mM. O extrato foi filtrado em gaze e centrifugado a 1500 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi coletado e submetido a uma ultracentrifugação a 100.000 x g por 30 min a 4 °C. O gradiente foi preparado com soluções de sacarose 25 e 45% (m/v) em tubos de 6 mL para rotor tipo *swing*, aplicando-se 2 mL de cada solução do gradiente e 2 mL da solução resultante da ressuspensão do pellet em solução contendo glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 100 mM (pH 7,6), EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e DTT 1 mM. Essa solução foi cuidadosamente adicionada ao gradiente e submetida à ultracentrifugação a 100.000 x g por 90 min a 4 °C. As fases foram coletadas e as proteínas precipitadas em três volumes de acetona 70%(v/v) durante 12 h a -20°C. Em seguida foram centrifugadas a 15000 x g por 30 min a 4°C, e estocadas a -80°C para análises posteriores.

2.2.1.4 Extração do FI das raízes

A extração do FI foi feita de acordo com Hammond-Kosack (1992), com modificações. As raízes foram separadas das plantas, lavadas com água corrente, e arrumadas em feixes envolvidos por parafilme. Segmentos de raízes de aproximadamente 2,5 cm foram cortados e lavados com água deionizada, para remover detritos da superfície e/ou contaminação citoplasmática, e acondicionados em seringas plásticas de 25 mL. Às seringas foi adicionada água deionizada para um volume final de 20 mL, contendo PMSF 1 mM e EDTA 1 mM. Em seguida, foram infiltradas à vácuo por 2 minutos a 4 °C. O excesso de água foi eliminado por gravidade e as raízes foram centrifugadas a 800 x g por 15 min a 4 °C. O FI foi recolhido, filtrado para remoção de microrganismos em filtro de 0,2 µm de porosidade (Millipore®). As proteínas foram precipitadas em três volumes de acetona 70% (v/v) durante 12 h a -20°C. Em seguida foram centrifugadas a 15000x g por 30 min a 4°C e estocadas a -80°C.

2.2.1.5 Extração de proteínas solúveis totais de raízes

Dois gramas de raízes foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz e acrescentou-se 15 mL de tampão de extração contendo PVPP 1% (m/v), EDTA 50 mM, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5), sacarose 0,7 M, β-mercaptoetanol 2% (v/v) e PMS 1 mM (Hurkman & Tanaka, 1986). Após 30 min de homogeneização sob agitação constante no gelo, foi adicionado o mesmo volume de fenol saturado em Tris-HCl (pH 8,5), seguido de mais 30 min de homogeneização nas mesmas condições. O material foi então centrifugado por 30 min a 10.000 x g a 4 °C, e a fase fenólica foi transferida para um novo tubo. Este processo foi repetido mais duas vezes. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas a -20 °C por 16 h. Em seguida, o extrato protéico foi centrifugado por 30 min a 10.000 x g a 4 °C. O pellet recuperado foi lavado duas vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol gelado e uma vez em acetona gelada. A cada etapa o extrato foi incubado por 30 min a -20 °C e centrifugado por 30 min a 10.000 x g a 4 °C. O pellet, após estar completamente seco foi dissolvido em tampão de solubilização para eletroforese bidimensional.

2.2.1.6 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita segundo o método descrito por Bradford (1976), utilizando reagente comercial fabricado pela BioRad. Para a determinação das concentrações de proteínas foi utilizada uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

2.2.1.7 Análise de proteínas por eletroforese bidimensional

2.2.1.7.1 Focalização isoeletrica

Um total de 500 µg de proteínas foi dissolvido em solução Tris-HCl 50mM (pH 8,8), uréia 7M, tiuréia 2M, Triton 0,4% (v/v), CHAPS 2% (m/v), DTT 70 mM, anfolinas 0,8% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 não-linear; Amersham GE Healthcare) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Os extratos de proteínas do FI foram dissolvidos em Tris-HCl 50mM (pH 8,8), SDS 0,5% (m/v), uréia 8M, DTT 65 mM, CHAPS 4% (m/v), anfolinas 0,8% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 não-linear; Amersham GE Healthcare) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Estas soluções foram mantidas sob agitação por 1 min, seguido de 1 hora de repouso, e depois novamente agitadas por mais 1 min. Em seguida, os extratos foram aplicados sob fitas impregnadas com acrilamida desidratada (IPG 18 cm, gradiente de pH 3-10 não-linear; Amersham GE Healthcare) e sobre estas, foram acrescentados 1,5 mL de óleo mineral (Fluid Cover, Amersham GE Healthcare) para evitar evaporação dos reagentes durante a reidratação. As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica (IPGphor, Amersham GE Healthcare) durante 12 horas a 20°C. A focalização isoeletrica foi feita utilizando-se gradiente de pH imobilizado, nas seguintes condições: 150V durante 1 hora, 350V durante 1 hora, 500V durante 1 hora, 1000V durante 1 hora, 5000V durante 12 horas ou mais até completar 60 kVh. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram lavadas com água deionizada e armazenadas a -80°C.

2.2.1.7.2 SDS-PAGE

Após a focalização isoeletrica, as fitas IPG foram lavadas com água deionizada, equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfetos. A primeira solução de equilíbrio era composta por Tris-HCl 50mM (pH 6,8), uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 2% (m/v). A segunda solução era composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), iodoacetamida 2,5% (m/v) (Görg et al., 1987) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). As fitas IPG foram equilibradas por 10 minutos em cada solução.

A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida (180x160x1 mm), conforme modificação do descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado com acrilamida-Bis-acrilamida (37,5:1; m/m) na concentração final de 12,5% (m/v), Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v), e TEMED 0,05% (v/v). Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e cobertas com uma solução de agarose 0,5% (m/v) em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% - m/v). A separação eletroforética das proteínas foi feita a 10°C, em cuba SE 600 (Amersham GE Healthcare). Na primeira etapa, utilizou-se 90V fixos durante 10 minutos. Na segunda etapa, utilizou-se 30mA por gel durante aproximadamente 3-4 horas.

2.2.1.8 Coloração com prata

Após a eletroforese, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com prata, conforme modificação do método de Blum et al. (1987). Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora (etanol 50% v/v, ácido acético 12% v/v, formaldeído 0,075% m/v), por 3 h; 3 lavagens com etanol 50% (v/v) 3x 20 min; solução de sensibilização (tiosulfato de sódio 0,02% m/v), por 1 min; água deionizada, 3x 20 s; solução de impregnação (nitrato de prata 0,2% m/v, formaldeído 0,075% v/v), por 20 min; água deionizada, 3 vezes de 20 s; solução de revelação (carbonato de sódio 6% m/v, tiosulfato de sódio 0,0008% m/v, formaldeído 0,05% v/v) até o aparecimento das bandas; solução bloqueadora (ácido acético 5% v/v), por 10 min.

2.2.1.9 Coloração com coomassie blue

Após a eletroforese, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com *coomassie blue* coloidal, conforme modificação do método descrito por Candiano et al (2004). Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora (etanol 50% v/v e ácido fosfórico 3% v/v), duas vezes de 1 h; lavagem com ácido fosfórico 2% (v/v) por 1 h; solução de coloração (ácido fosfórico 10% v/v, sulfato de amônio 15% m/v, etanol 17% v/v, *coomassie blue* coloidal 0,1% m/v), por 12 h. O excesso de corante foi removido com duas lavagens em água deionizada e os géis conservados em solução de estoque (sulfato de amônio 15% m/v).

2.2.1.10 Aquisição das imagens

As imagens dos géis de proteínas de membrana plasmática e do FI de raízes de cana-de-açúcar após separação por eletroforese bidimensional foram obtidas por fotografia digital. As análises dos géis foram feitas com o programa Image Master 2D versão 3.10 (Amersham GE Healthcare). As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular ("Broad Range" - Molecular Weight Marker, BioRad). Como padrão de ponto isoelétrico foram utilizados dados gerados pela análise do mapa teórico do programa Image Master 2D 3.10.

2.2.1.11 Digestão tripídica

As proteínas (*spots*) detectadas foram retiradas dos géis, cortando-se manualmente os géis em frações de aproximadamente 1 mm³, lavadas com água e descoradas com bicarbonato de amônio 25 mM e acetonitrila 50% (v/v) por duas vezes de 30 min. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 min, a solução excedente foi descartada e os fragmentos de géis foram secos por evaporação e reidratados numa solução de DTT 20 mM em bicarbonato de amônio 50 mM e incubados por 40 min a 60 °C. O excesso de solução foi removido e os fragmentos de gel foram incubados numa solução de iodoacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 50 mM por 40 min à temperatura ambiente no escuro. Após esta etapa, o excesso de solução foi descartado e os géis lavados com bicarbonato de amônio 50mM. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila 100%, secos por evaporação e reidratados com uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo tripsina numa concentração final de 166 ng de tripsina por *spot*. Os fragmentos de géis foram incubados nesta solução de digestão por 14 h a 37 °C.

Após a digestão tripídica das proteínas, os peptídeos foram eluídos dos géis por sonicação (frequência de 40 kHz e potência de 30 W) em solução de acetonitrila 60% (v/v) e ácido fórmico 1% (v/v) duas vezes de 40 min a 45 °C e uma vez por 20 min com acetonitrila 100% a 45 °C. As soluções contendo os peptídeos extraídos foram secas à temperatura ambiente em um concentrador a vácuo, seguidas de ressuspensão em solução de ácido fórmico 1% (v/v) e transferidas para tubos apropriados para o espectrômetro de massas.

2.2.1.12 Sequenciamento das proteínas

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo Q-ToF Ultima API (ESI-MS/MS) quadrupolo/aceleração orthogonal time-of-flight da Water-Micromass acoplado a um sistema *on line* de HPLC capilar CapLC (Waters®).

A separação dos peptídeos foi realizada por HPLC usando uma pré-coluna de fase reversa C18 (Sentry™ Guard Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry™ C18 5 µm 0,32x150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos da segunda coluna usando um gradiente do tampão A (acetonitrila 5% v/v e ácido fórmico 0,1% v/v) e do tampão B (acetonitrila 95% v/v e ácido fórmico 0,1% v/v). O fluxo da amostra durante a corrida foi de 5 µL min⁻¹ nos primeiros 15 min, 2 µL min⁻¹ entre 15 e 40 min e de 5 µL min⁻¹ nos cinco minutos finais para lavagem da coluna. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS dentro de uma amplitude de 50 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo. Todos os parâmetros foram definidos pelo programa MassLynx v 2.1 (Waters® Mass-Lynx).

2.2.1.13 Análises das informações

Os espectros gerados foram comparados com dados depositados no The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org>) e National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Peptídeos sem homologia em nenhum dos bancos acima descritos foram comparados com sequências de bancos de dados públicos usando BLASTp (Basic Lenth Alignamment Search Tool), um algoritmo que permite a identificação de proteínas via alinhamento preciso de sequências curtas de aminoácidos (*short nearly, exact matches*). Uma das proteínas com acúmulo induzido no FI de raízes micorrizadas apresentou similaridade com peroxidases e foi designada POX1.

2.2.2 Atividade de peroxidases no FI de raízes de cana-de-açúcar

2.2.2.1 Extração de proteínas para determinação da atividade de peroxidases

A extração de proteínas para determinação da atividade de peroxidases foi feita a partir de 2 g de raízes de cana-de-açúcar macerados em almofariz com nitrogênio líquido e homogeneizados em 6 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo EDTA 1

mM, DTT 3 mM e PVPP 1% (m/v). Este homogeneizado foi centrifugado a 10000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e estocado a -80 °C.

2.2.2.2 Atividade de Guaiacol Peroxidase

Para este ensaio foram utilizadas amostras do FI de raízes de cana-de-açúcar coletadas oito semanas após a inoculação, e extrato de proteínas de raízes coletadas quatro, seis e oito semanas após a inoculação.

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada por espectrofotometria, segundo Matsuno e Uritani (1972), utilizando-se 10 µL do extrato de proteínas, 20 µL de guaiacol 0,5% (v/v) e 810 µL de tampão fosfato-citrato (fosfato de sódio dibásico 200 mM e ácido cítrico 100 mM) pH 5,0. A esta mistura foi adicionado 20 µL de H₂O₂ (1:10) sob agitação e incubou-se por 15 min a 30 °C. Após a reação ser interrompida pela adição de 20 µL de metabissulfito de sódio 2% (m/v), a atividade foi avaliada pela determinação de variação da absorbância a 450 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde ao aumento de 0,001 na A₄₅₀ por min. A atividade enzimática foi normalizada pela quantidade total de proteínas.

2.2.2.3 Atividade da Ascorbato Peroxidase

A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981), através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm a 30 °C. O meio de reação foi composto de 660 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM pH 7,0, 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 mM, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 40 µL de extrato de proteínas, totalizando um volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de ascorbato. O decréscimo na absorbância a 290 nm foi monitorado por 60 segundos contados a partir do início da reação.

Para este ensaio foram utilizadas amostras do FI de raízes de cana-de-açúcar coletadas oito semanas após inoculação, e extrato de proteínas de raízes coletadas quatro, seis e oito semanas após inoculação.

2.2.2.4 Atividade de Guaiacol Peroxidase em gel

A atividade de guaiacol peroxidase em gel foi determinada após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturante. O gel foi preparado com acrilamida na concentração

final 7,5% e 4%, gel de separação e empilhamento, respectivamente, e Bis-acrilamida (37,5:1 m/m), Tris-HCl 375 mM (pH 8,0), persulfato de amônio 0,05% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v). A separação eletroforética das peroxidases foi realizada sob corrente constante de 20 mA por um período de 90 min a 10°C, em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM). Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução contendo tampão fosfato 50 mM pH 6,0, guaiacol 50 mM e H₂O₂ 0,1% (v/v) durante 10 min (Ridge e Osborne, 1970). As bandas reveladas por essa reação foram registradas por fotografia digital.

2.2.3 Clonagem do gene codificante POX1 em raízes de cana-de-açúcar

2.2.3.1 Análise Filogenética de peroxidases

Baseado na informação da sequência da peroxidase gerada pela busca feita no NCBI National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) foi realizada uma busca de peroxidases das gramíneas arroz e milho, além da cana-de-açúcar disponíveis no The Institute for Genomic Research –TIGR (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species). Todas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das peroxidases encontradas foram alinhadas utilizando o programa ClustalX. A análise de agrupamento foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* e visualizada pelo programa Tree-View (PAGE, 1996). As sequências mais similares às sequências geradas pela espectrometria foram reanalisadas em um novo alinhamento utilizando o programa Clustal X. Para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizada a sequência do acesso de cana-de-açúcar (TC50215) e consenso deste último alinhamento, procurando regiões conservadas entre as sequências.

2.2.3.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

O programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) foi utilizado para determinar os oligonucleotídeos ideais para amplificar um fragmento do gene POX1. Depois de estabelecidos estes critérios, as sequências dos oligonucleotídeos foram testadas quanto às possibilidades de formação de dímeros, utilizando os programas NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) e Operon.

O par de oligonucleotídeos iniciadores definido foi utilizado para amplificações a partir do DNA genômico e cDNA, e para análises da PCR em Tempo Real (qPCR).

2.2.3.3 Extração de DNA genômico de folhas

O DNA genômico foi extraído de folhas de cana-de-açúcar conforme metodologia descrita por Edwards et al. (1997) acrescidas de algumas modificações. Cinco gramas de folhas de cana-de-açúcar foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e transferidos 50 mg para tubos de 2 mL. A este material foi adicionado 800 µL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 700 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0) contendo etil xantana potássio 6,25 mM e incubado por 1 hora a 65 °C. Após este período foram realizadas duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) seguidas de centrifugações a 12000 x g por 5 min e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) seguido de igual centrifugação. O DNA foi precipitado com um volume igual de isopropanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) por 1 hora à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4 °C. O pellet foi lavado com etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado a 12000 x g por 5 min, seco à temperatura ambiente, dissolvido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a -20 °C.

A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para visualização do DNA (Sambrook et al. 1989). A aquisição da imagem do gel foi feita utilizando-se um densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham GE Healthcare).

2.2.3.4 Extração de RNA de raízes

Amostras de 500 mg de raízes foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido, e o RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Ao macerado de raízes foi acrescentado 1,5 mL de Trizol seguido de homogeneização por 15 seg. Em seguida as amostras foram incubadas por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida em tubos novos e precipitada com isopropanol por 10 min a 30 °C e centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida o pellet contendo o RNA foi lavado em etanol 75% (v/v) agitado por 30 seg e centrifugado a 7.500 x g por 10 min a 4 °C. O RNA total foi dissolvido em água tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% (H₂O DEPC) e estocados a -80 °C.

A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, (m/v) utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para visualização do RNA (Sambrook et al. 1989).

A aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham GE Healthcare).

2.2.3.5 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 2 µg de RNA total de cada tratamento, 50 ng de iniciadores Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎ e H₂O DEPC para volume final de 12 µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 10 min e resfriado em gelo por 1 min. Foi adicionado tampão PCR 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 500 µM e DTT 10 mM. As amostras foram incubadas por 5 min a 42°C e, em seguida foi adicionado 200 U de transcriptase reversa Superscript II. Incubou-se por 50 min a 42°C. A enzima 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.

O cDNA obtido foi utilizado nas amplificações por PCR realizadas nas seguintes condições: solução tampão PCR 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 4 mM MgCl₂, 3 mM dNTPs 0,1 µM de iniciadores específicos para POX1 e 1 U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C e uma extensão final por 10 min a 72°C.

Os produtos da PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes) após varredura em densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham GE Healthcare).

2.2.3.6 Amplificação do DNA e cDNA por PCR

Para a amplificação do fragmento do gene que codifica POX1 foi utilizado o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados por Invitrogen (Invitrogen, California, USA): POX1 F (5'-CTTTGCCTCCAAGAACCTCA-3') e POX1 R (5'-CAGTTGCGCCTGATCTCG-3'). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 3 mM, iniciadores POX1 R e F 10 pmol, 10 ng de DNA genômico ou cDNA dos tratamentos e 1 U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo a 94°C por 2 min, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 1 min a 72°C e uma extensão final por 5 min a 72°C.

Os produtos da reação acima foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes) após varredura em densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham GE Healthcare).

2.2.3.7 Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos obtidos a partir da amplificação de DNA genômico e cDNA utilizando os iniciadores para POX1 foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), de acordo com 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 Tris-HCl 30 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, PEG 5% (m/v) e 3 U de DNA ligase T4. Esse material foi incubado a 4°C durante 12 h. Em seguida, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico utilizando-se a reação de ligação obtida. Após plaqueamento em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside, 20 µg mL⁻¹) foram selecionadas colônias brancas, contendo o plasmídeo recombinante. As bactérias contendo plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio LB líquido com ampicilina (50 µg mL⁻¹ de meio) sob agitação constante de 150 rpm a 37°C durante 15 horas.

2.2.3.8 Extração dos plasmídeos

Após o cultivo das bactérias em meio LB líquido a 38°C sob agitação por 22 h, o meio foi centrifugado a 4000 x g por 5 min a 4°C. O pellet foi lavado com solução contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0) e glicose 50 mM. Em seguida, foi adicionada a solução contendo SDS 1%, NaOH 0,2N e incubada no gelo por 10 min. Foi adicionada a solução contendo acetato de potássio 3 M e ácido acético 10% (v/v), misturada por inversão, incubada em gelo por 10 min e centrifugada a 4000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para nova placa, sendo adicionado 15 µg de RNaseA, e incubou-se a 37°C por 20 min. O DNA foi precipitado com isopropanol gelado e incubado em gelo por 5 min. O precipitado foi centrifugado a 4000 x g por 40 min a 4°C e o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado. O pellet foi então seco e dissolvido em água deionizada esterilizada. A concentração de DNA foi determinada através de 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 Probes) após varredura em densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham GE Healthcare).

2.2.3.9 sequenciamento utilizando “DYEnamic ET Terminator”

Para o sequenciamento dos clones obtidos foi utilizada uma alíquota de 200-500 ng de DNA plasmidial. A reação continha 10 pmol do iniciador M13F, 2 µL de "DYEnamic ET Terminator" (Amersham GE Healthcare), 2 µL de tampão “Save Money” (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e MgCl₂ 5 mM) e água deionizada para um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 min a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% (v/v). As soluções foram centrifugadas 4000 x g por 45 min e os péletes foram lavados em etanol 70% (v/v). Os péletes foram secos no escuro por no mínimo 2 horas e ressolubilizados em formamida.

2.2.3.10 Análises das sequências

As sequências dos clones de cDNA foram inicialmente analisadas pelo programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) para remoção de vetor contaminante e bases de baixa qualidade. Foram aceitas apenas as sequências que apresentaram pelo menos 300 bases com qualidade > 20. Este valor de qualidade representa 1 erro em cada 100 bases lidas. As sequências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do NCBI, TIGR e SUCEST.

2.2.4 Análise da expressão do gene POX1

2.2.4.1 Amplificação dos fragmentos de cDNAs por qPCR

O cDNA gerado a partir de RNA total das raízes dos diferentes tratamentos foi quantificado por qPCR em solução comercial PlatSybr qPCR de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 1 µL de cDNA diluído 10x e 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador POX1. As condições da amplificação foram as seguintes: 2 min a 94 °C, 45 ciclos de 45 seg a 94 °C, 11 seg a 60 °C, 30 seg a 72 °C e uma extensão final por 5 min a 72 °C. A amplificação foi realizada em termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Reasearch) com detecção da fluorescência emitida a cada ciclo da PCR. A cinética das reações foram registradas e as curvas do aumento de cópias do cDNA original foram geradas pelo programa Rotor-Gene Real-Time versão 6.0 (Corbett Reasearch), que fornece os valores de ciclo-limite de leitura (Ct), eficiência da PCR (E) e valores de R². A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo proposto por Pfaffl (2002) com auxílio do programa REST-2005 (Corbett Research).

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Colonização micorrízica

As médias das taxas de colonização intrarradicular das plantas inoculadas com *G. clarum* (Gc) cultivadas em baixo (BP) e alto teor de P (AP) são apresentadas na Figura 1. As plantas não inoculadas (Ni), utilizadas como controle, não apresentaram colonização.

De uma maneira geral, a colonização micorrízica em condições de baixo P não diferiu estatisticamente ao longo do período experimental. Já em condições de alto P, a colonização micorrízica aumentou de apenas 11,3% quatro semanas após a inoculação para 34,4% oito semanas após a inoculação. Esse dados mostram que o alto teor de P inibiu significativamente o desenvolvimento da MA.

A colonização micorrízica em condições de baixo teor de P foi 4,4 vezes maior do que a colonização em condições de alto P quatro semanas após a inoculação. Já, oito semanas após a inoculação, a colonização em condições de baixo P foi 1,7 vezes maior do que em condições de alto P.

Taxa de colonização intrarradicular a 4, 6 e 8 semanas após inoculação

Figura 1 – Taxa de colonização intrarradicular de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* (Gc) após quatro, seis e oito semanas de cultivo em condições de baixo P (20 mg P kg⁻¹) (BP) e alto P (200 mg P kg⁻¹) (AP). Os dados são médias de 4 repetições ± desvio padrão da média. Os tratamentos não-inoculados não apresentaram colonização micorrízica

No segundo experimento, as plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P, também apresentaram colonização intrarradicular maior do que plantas inoculadas e cultivadas em condições de alto P (Fig. 2). Com o aumento da concentração de P no substrato de cultivo das plantas inoculadas com *G. clarum*, a colonização diminuiu de 35,4% para 5,7%. As plantas não-inoculadas, utilizadas como controle, não apresentaram colonização micorrízica.

Muitos trabalhos relatados na literatura confirmam que o aumento do teor de P diminui a taxa de colonização das raízes pelos FMAs em diversos modelos vegetais (Harrison, 1999; Graham, 2001; Siqueira, et al., 2002; Vierheilig, 2004), embora a maioria deles não explique o papel fisiológico ou bioquímico que o P desempenha no controle da simbiose (Harrison, 2005).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o efeito do P no desenvolvimento de MAs. Fosfatases acumuladas nas raízes, em condições de alto nível de P, formariam dímeros com lectinas, as quais bloqueariam a penetração do fungo (WOOLHOUSE, 1975). Alternativamente, baixo suprimento de P reduziria a síntese de fosfolipídeos, tornando as células mais permeáveis, o que facilitaria a colonização da raiz (GRAHAM et al., 1981). Outra hipótese propõe que aumento da disponibilidade de P no solo, induziria o maior acúmulo de açúcares no tecido radicular e, estes açúcares teriam efeito inibitório sobre o crescimento de propágulos fúngicos (SIQUEIRA, 1983).

Taxa de colonização intrarradicular após oito semanas de inoculação

Figura 2 – Taxa de colonização intrarradicular de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* (Gc) após oito semanas de cultivo em condições de baixo P (20 mg P kg⁻¹) (BP) e alto P (200 mg P kg⁻¹) (AP). Os dados são médias de 20 repetições $\pm$ desvio padrão da média. Os tratamentos não-inoculados não apresentaram colonização micorrízica

2.3.2 Análise do proteoma da membrana plasmática

A análise das proteínas de membrana plasmática por eletroforese bidimensional é apresentada na Figuras 3. As proteínas detectadas na membrana plasmática de plantas não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P (NiBP), não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P (NiAP), inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de P (GcBP) e inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de P (GcAP) foram impregnadas com coomassie blue. As proteínas apresentam pI variando de 3,2-6,9 e massa molecular aparente variando de 14 a 97 kDa.

A baixa abundância de proteínas da membrana plasmática após detecção por coloração com coomassie blue pode ser atribuída a algumas dificuldades metodológicas no preparo das amostras para análise por espectrometria de massas como: provável digestão ineficiente ou baixa taxa de eluição dos peptídeos dos fragmentos de géis. Esses fatores diminuíram consideravelmente o sucesso da identificação de diversas proteínas por espectrometria de massas. Devido a todos esses fatores não foi possível selecionar apenas proteínas com acúmulo diferenciado em cada tratamento, sendo que apenas sete proteínas tiveram as sequências de aminoácidos dos peptídeos gerados por digestão com tripsina e analisadas por espectrometria de massas (Tabela 1).

Quatro dessas proteínas (1, 2, 4 e 7) apresentaram similaridade com proteínas de membranas de outras organelas como mitocôndria. O fato de encontrar proteínas de membranas de mitocôndrias na fração de proteínas de membrana plasmática é comum, uma vez que o método de centrifugação em gradiente de sacarose, utilizado para separação, tem baixa eficiência. Mesmo utilizando-se da estratégia de uma ultracentrifugação do extrato protéico previamente à ultracentrifugação em gradiente de sacarose com o intuito de minimizar as contaminações por membranas de outras organelas (Valot, et al., 2006).

Estudando proteínas de membrana celular de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *Glomus intraradices* (Valot et al., 2005) e *G. mosseae* (Gianinazzi-Pearson & Brechenmacher, 2004) foi observado um baixo número de proteínas. Valot, et al (2005) verificaram contaminação da fração de proteínas de membranas com proteínas citossólicas e discutiram a dificuldade de separação de proteínas solúveis das insolúveis. Aliada a essa dificuldade de separação de proteínas insolúveis, está a dificuldade da separação por eletroforese bidimensional de proteínas de membranas (Ferro, et al., 2000). Muitas dessas proteínas não têm

uma característica de migração compatível com a técnica quando comparada à eletroforese unidimensional por SDS-PAGE devido aos tratamentos de redução e alquilação (Valot, et al., 2005).

Uma das razões do baixo número de spots detectados no gel é a limitação da técnica de coloração das proteínas. A técnica deve ter reprodutibilidade e alta sensibilidade, permitindo a visualização do maior número possível de proteínas e, ao mesmo tempo, ser compatível com o método de análise utilizado em seguida, como a espectrometria de massas (Candiano, et al., 2004; Görg, et al., 2004).

A sensibilidade do nitrato de prata para a visualização de proteínas em gel de poliacrilamida é cerca de 50 vezes maior que a do coomassie blue. Porém, o nitrato de prata apresenta baixíssima compatibilidade com a espectrometria de massas por Q-ToF (Shevchenko et al., 2001).

A abundância relativa das proteínas da membrana plasmática que tiveram suas sequências parciais definidas por espectrometria de massas está representada na figura 4. Essa análise permitiu observar a variação do acúmulo de cada proteína nos diferentes tratamentos experimentais.

A proteína 1 teve similaridade com subunidade I de ATPase e seu acúmulo foi superior em raízes controle não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P. Esse acúmulo parece ser fortemente induzido pela diminuição do teor de P, pois de forma semelhante, o acúmulo dessa proteína em raízes colonizadas e cultivadas em baixas condições de P foi superior aos tratamentos de condições de alto P. O mesmo comportamento foi verificado nas proteínas 2, 3, 4, 5 e 6. Dentre essas, as proteínas 2 e 4 também apresentaram similaridade com proteínas de membrana de mitocôndria.

A extração das proteínas da membrana das raízes de cana-de-açúcar possibilitou ainda a identificação de uma enzima citossólica: gliceraldeído trifosfato desidrogenase (GAPDH), que está envolvida diretamente no metabolismo de açúcares. Uma permease transportadora de vitamina B12 e uma flavina redutase monoxigenase também foram encontradas.

Figura 3 – Separação de proteínas da membrana plasmática de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), através de eletroforese bidimensional. A focalização isoeletrica foi feita utilizando gradiente de pH linear (3-10). Coloração das proteínas foi feita com coomassie blue G250

Tabela 1 – Sequências de peptídeos de proteínas da membrana plasmática de raízes de cana-de-açúcar determinadas por espectrometria de massas sequencial de fragmentos resultantes da digestão com Tripsina

Spot	Proteína provável	pI aparente	MM aparente (kDa)	Sequência com mais homologia			Peptídeos
				Nº de acesso	Espécie mais homóloga	Score	
1	ATPase subunit 1	5,08	63,37	YP_762487	<i>Tripsacum dactyloides</i>	8,00E-04	RAAELTTLLESRM
2	mitochondrial processing peptidase	5,45	62,98	BAE98412	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,016	DTGLFGVYAVAK
3	Monooxygenase/ Flavin Reductase	4,7	62,43	CAJ95730	<i>Ralstonia eutropha</i>	28,2	PLLLWCLR
4	ATP synthase beta subunit	6,81	47,3	BAD82522	<i>Oryza sativa</i>	3,2	KVVDLLAIFQRG
5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7,2	4,06	P34921	<i>Dianthus caryophyllus</i>	0,052	KAGIALNDNMIKL
6	vitamin B12-transporter permease	5,09	38,4	YP_049929	<i>Erwinia carotovora</i>	28,2	PLLLWLCR
7	cytochrome b5	4,2	28,6	CAA53366	<i>Oryza sativa</i>	5,00E-10	KFLEDHPGGDDVLLSSTGKD VATVLLVK

Figura 4 – Abundância relativa das proteínas da membrana plasmática de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), analisadas por espectrometria de massas e indicadas na figura 3

Ramos (2001) trabalhando com vesículas purificadas de membrana plasmática isoladas de raízes de milho, inoculadas ou não com *Glomus clarum* ou *Gigaspora margarita*, observou que nos eventos iniciais da interação micorrízica (30 dias após a inoculação) ocorria inibição da atividade específica da ATPase. Já, após o estabelecimento da colonização fúngica, as raízes colonizadas apresentaram atividades de ATPases superiores às encontradas no tratamento não inoculado, as quais dependiam do FMA envolvido (Ramos, 2001). Analisando a atividade de ATPases em frações microssomais, sob as mesmas condições do estudo acima, uma ativação significativa foi encontrada em vesículas oriundas de raízes colonizadas, em todas as épocas estudadas, desaparecendo a inibição encontrada em frações purificadas de membrana plasmática (Ramos et al., 2005). Bago et al. (1997) estudaram a atividade de ATPases de membrana plasmática de vesículas microssomais em raízes micorrizadas de girassol (*Helianthus annuus*) e cebola (*Allium cepa*), encontrando um decréscimo da atividade com o tempo, sendo este maior em plantas não inoculadas. Segundo Benabdellah et al. (1999), a porcentagem de colonização micorrízica possui correlação positiva com a atividade de ATPases de membrana plasmática tanto em raízes de tomate colonizadas por *G. mosseae* como por outros FMAs. O FMA poderia

estar atuando na regulação das ATPases, especificamente, aumentando a eficiência de acoplamento entre hidrólise de ATP e transporte de H^+ . Porém, os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda permanecem desconhecidos. Recentemente, complementando os estudos anteriores, Krajinski et al. (2002) revelaram a presença de um gene de H^+ -ATPase tecido-específico em *Medicago truncatula*, o qual é expresso apenas em células radiculares contendo arbúsculos e que não ocorreu em outros tecidos.

2.3.3 Análise do proteoma de raízes

Na Figura 5 são apresentadas as separações de proteínas solúveis totais extraídas de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* (Gc) e não inoculadas (Ni), e cultivadas em baixo (BP) e alto (AP) teor de P. O critério inicial para seleção dessas proteínas para a espectrometria de massas foi a maior intensidade verificada nos spots, porém, o baixo rendimento encontrado na condução da digestão com tripsina e eluição dos peptídeos dos géis possibilitaram a definição das sequências de aminoácidos de apenas 21 proteínas por espectrometria de massas (Tab. 2).

O perfil do acúmulo dessas proteínas nos diferentes tratamentos é apresentado na Figura 6.

Figura 5 – Separação de proteínas solúveis totais de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (GcBP) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), através de eletroforese bidimensional. A focalização isoeétrica foi feita utilizando gradiente de pH linear (4-7). Coloração das proteínas foi feita com coomassie blue G250

Tabela 2 – Sequências de peptídeos de proteínas solúveis totais de raízes de cana-de-açúcar determinadas por espectrometria de massas sequencial de fragmentos resultantes da digestão com Tripsina (continua)

Spot	Proteína provável	pI aparente	MM aparente (kDa)	Sequência com mais homologia			Peptídeos
				Nº de acesso	Espécie mais homóloga	Score	
1	unknown protein	5,41	98	BAD35259	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-2	(-)LLAAQRHPAAR(-)
2	Heat shock protein	5,23	83,3	ABE80735	<i>Medicago truncatula</i>	6,00E-06	(K)NAVVTVPAYFNDSQR(Q) (R)FSDASVQMRR(Q) (R)VEIANDQGIR(T) (K)DAGVIAGLRGLR(I)
3	hypothetical protein	5,29	64,9	BAD87825	<i>Oryza sativa</i>	0,012	(-)RQWNSLLGLAPRK(-)
4	putative cytochrome D ubiquinol oxidase	5,86	97,32	ZP_00568538	<i>Frankia sp.</i>	5,5E-03	(-)AEHLVPGYR(-)
5	hypothetical protein	5,97	97,3	AAP04193	<i>Oryza sativa</i>	0,021	(-)GCFFWKSFGG(-)
6	actin 1	5,38	63	AAC64126	<i>Anemia phyllitidis</i>	1,00E-06	(R)VAPEEHPVLLTEAPARPK(Y) (R)GYSFTTSAQR(G) (R)AGFAGDDVVPK(C)
7	putative ATP-dependent RNA helicase	5,49	55,4	AAL24152	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,8E-03	(-)LLSATRLLEP(-)
8	Enolase, putative, expressed	5,88	65,2	ABB46861	<i>Oryza sativa</i>	3,00E-05	(-)VNQIGSVTESIEAVK(A)
9	Enolase, putative, expressed	5,92	64,83	ABB46861	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-04	(R)AAVPSGASTGIYEALRK(D)
10	ATPase subunit 1	5,03	64,7	YP_588408	<i>Zea mays</i>	0.007	(K)NILSTINPELLK(S) (R)AAELTTLSEIR(M) (R)VGSVGDGIAR(V) (K)TAIAIDTILIQK(Q) (K)LELAQYR(E)
11	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	5,9	56,1	AAO32639	<i>Aegilops tauschii</i>	1,00E-06	(K)GVTTIIGGGDSVAAVEK(A) (K)KPFAAVVGGSK(V) (K)LAAALPDGGVLLLENVR(F)
12	GRP-like protein 2	5,75	52,1	ABG76000	<i>Gossypium hirsutum</i>	4,00E-05	(K)VPEGFDYELYNR(N) (K)YIYTIDDDCFVAK(D) (K)DVNALEQHIK(N) (K)ASNPVFVNLK(K)
13	malate dehydrogenase	6,03	60,7	AAK58078	<i>Zea mays</i>	0.004	(K)LDATAQDLTEEK(T) (K)IVQGLPIDEHPR(K) (R)LSVQVSDVK(N) (K)VLVVANPANTRAILK(E) (K)MMLVDAAFPLLK(G) (K)MELVDAAFPLLK(G)

Tabela 2 – Sequências de peptídeos de proteínas solúveis totais de raízes de cana-de-açúcar determinadas por espectrometria de massas sequencial de fragmentos resultantes da digestão com Tripsina (conclusão)

Spot	Proteína provável	pI aparente	MM aparente (kDa)	Sequência com mais homologia		Score	Peptídeos
				Nº de acesso	Espécie mais homóloga		
14	cytosolic 3-phosphoglycerate kinase	6,32	58,1	AAO32638	<i>Triticum urartu</i>	1,00E-06	(K)LAAALPDGGVLLLENVR(F) (K)KPFAAVVGGSK(V) (K)IGVIESLLAK(V) (K)GVTTIIGGGDSVAAVEK(A) (-)QDLLLPFFMEMR(-) (K)TAAAYGHFGR(T)
15	S-adenosylmethionine synthetase	5,16	52,1	CAJ45556	<i>Oryza rufipogon</i>	3,0E-02	(K)TAAAYGHFGR(T)
16	Isoflavone reductase homolog	5,5	41	P52580	<i>Zea mays</i>	3,00E-04	(K)SQVTVEYR(D) (R)FFPSEFGLDVDR(T) (K)GDLYDQASLVSAVK(G) (K)ILVVG GTGYLGR(H)
17	malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	6,52	51,1	XP_001215536	<i>Aspergillus terreus</i>	0.094	(K)LFGVTTLDVVR(A) (-)QTNFNLLRALE(-) (-)SAANFNLLRALE(-)
18	G protein beta subunit-like polypeptide	6,64	48,9	ABA01155	<i>Chlamydomonas incerta</i>	0,012	(K)DVLSVAFSVDNR(Q) (R)LWDLSTTVTGR(R)
19	Enolase, putative, expressed	5,26	38,3	ABB46861	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-07	(R)AAVPSGASTGVYEALR(D)
20	nucleoside diphosphate kinase	6,68	28,3	AAT70416	<i>Oryza sativa</i>	0,016	(R)GLIGDIISR(F)
21	nucleotide diphosphate kinase	6,74	29,4	AAL04446	<i>Beta vulgaris</i>	3,00E-06	(K)IIGATNPLASEPGTIR(G) (R)GLIGKNISR(F)

Dentre as proteínas com sequências definidas por espectrometria de massas três delas (1, 3 e 5) foram similares a proteínas desconhecidas ou putativas. A proteína 1 teve seu acúmulo induzido pela escassez de P, tanto em raízes não-micorrizadas quanto em raízes micorrizadas. A proteína 3 teve seu acúmulo reduzido, especialmente, pela micorrização em condições de baixo P. Essas proteínas sem identificação definidas que têm o acúmulo modificado, seja em função da micorrização, seja em função das condições de P, são potenciais proteínas para estudos mais detalhados. A proteína 2 apresentou similaridade com proteína heat shock que pertence à categoria de proteínas relacionadas aos processos celulares e está envolvida, dentre outras

funções, nos mecanismos ligados ao estresse (Leone et al., 2000). A proteína 4 apresentou similaridade com citocromo D ubiquinol oxidase e teve seu acúmulo suprimido pela micorrização em condições de baixo P. Outras três proteínas (8, 9 e 19) apresentaram similaridade com enolase. Dentre essas três, as proteínas 8 e 9 tiveram seus acúmulos induzidos em raízes micorrizadas em condições de alto P. Enquanto que a proteína 19 apresentou maior acúmulo em raízes não-micorrizadas e cultivadas em condições de baixo P. Enolase é uma enzima citoplasmática envolvida na glicólise, catalisando a interconversão da fosfoenol piruvato e do fosfoglicerato (Lal, 1991). O estudo do proteoma de arroz demonstrou que, sob estresse salino, há uma superexpressão dessa enzima, e que a mesma, pode ser detectada em diferentes regiões de géis bidimensionais (Yan et al., 2005).

Duas proteínas (20 e 21) apresentaram similaridade com nucleosídeo difosfato quinase. A proteína 21 teve acúmulo induzido pela escassez de P, independente do fator colonização micorrízica, e a proteína 21 não apresentou variações significativas entre os tratamentos. Nucleosídeo difosfato quinases são proteínas envolvidas diretamente no metabolismo de açúcares (Lal, 1991). Duas proteínas (13 e 17) tiveram similaridade a malato desidrogenase, uma enzima chave no ciclo do ácido cítrico localizada nas mitocôndrias (Gietl, 1992).

Figura 6 - Abundância relativa das proteínas solúveis totais de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), analisadas por espectrometria de massas e indicadas na figura 5

A influência da concentração de proteínas na taxa de identificação é bem relatada na literatura (Barnes et al., 2004), o que torna a identificação total do proteoma de um dado tecido

bastante limitada. Celedon (2006), trabalhando com proteínas da região cambial de eucalipto, detectou, por eletroforese bidimensional, 523 spots potencialmente identificáveis por espectrometria de massas. Porém, apenas 112 (21,4%) tiveram suas sequências determinadas. A autora atribuiu a baixa taxa de identificação a dois fatores principais: a presença de contaminantes que dificultem o acesso da tripsina durante a digestão das proteínas; modificações na sequência das proteínas que interferem na digestão enzimática ou mesmo na eluição dos peptídeos originados pela digestão.

Moléculas contaminantes podem ter origem no próprio tecido vegetal, como polissacarídeos e lipídeos que podem formar complexos com proteínas, diminuindo a solubilidade das proteínas, o que pode alterar seu ponto isoelétrico e peso molecular, em função da mudança na taxa de migração. Também comum em tecidos vegetais é a presença de compostos fenólicos que podem modificar as proteínas por reações oxidativas (Saravan e Rose, 2004). Embora o coomassie blue seja eficiente na ligação com proteínas (Candiano et al., 2004), a hipótese de contaminantes deve ser considerada. Também é bem relatada a ligação irreversível da proteína com a malha de acrilamida do gel (Galvani et al., 2000).

Outra consideração importante é que, embora os sítios de acesso da tripsina sejam na lisina e arginina da região C-terminal, a presença de prolina na região carboxílica desses dois resíduos praticamente inibe a digestão (Snyder, 2000), da mesma forma que a presença de resíduos ácidos em um dos lados da ponte potencialmente clivável (Wilkinson, 1986). Assim, em alguns casos, como muitas proteínas básicas e hidrofóbicas, a sequência dos aminoácidos é um obstáculo à identificação das proteínas. (Shevchenko et al., 2000).

A espectrometria de massas, utilizada para o sequenciamento de peptídeos originados pela digestão tripídica de proteínas previamente separadas por eletroforese bidimensional, constitui uma estratégia eficiente para conhecer o conjunto de proteínas expressas em um tecido, sob determinadas condições bióticas ou abióticas. Entretanto, grande parte das proteínas submetidas à digestão e espectrometria de massas, não tem sua sequência de aminoácidos determinada ou detectada, provavelmente devido à baixa concentração dos peptídeos gerados.

Aliado a este fator, outras limitações inerentes à técnica podem contribuir para a baixa eficiência de recuperação dos peptídeos oriundos dos spots. Além disso, é difícil prever quantas proteínas possam compor um spot, visto que produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel. Gion et al. (2005) verificaram que 15,4% dos spots

identificados por espectrometria de massas correspondiam a misturas de proteínas. Gygi et al. (2000) observaram produtos de seis genes de levedura presentes em um único spot após eletroforese bidimensional. Porubleva et al. (2001) observaram que a presença de várias proteínas em um mesmo spot pode ser em função da degradação proteolítica, e fragmentos proteolíticos não podem gerar peptídeos triplicados suficientes para a análise por MS/MS, constituindo outro fator que pode contribuir para o insucesso da identificação de uma proteína.

Algumas estratégias, entretanto, vêm sendo desenvolvidas visando melhorar a separação de proteínas e conseqüentemente aumentando a eficiência de identificação. Dentre elas, técnicas de fracionamento alternativas à eletroforese bidimensional, como a cromatografia líquida bidimensional (2D-HPLC), que utiliza uma coluna de troca iônica na primeira dimensão e outra de fase reversa na segunda dimensão, a qual separa as proteínas em frações antes de serem digeridas (Wagner et al., 2000). Recentemente uma técnica de separação de alta resolução foi desenvolvida por Essader et al. (2005), na qual as proteínas foram separadas na primeira dimensão em fitas de acrilamida com gradiente estreito de pH, e, em seguida foram recortadas em pequenos pedaços para que os peptídeos fossem recuperados em uma série de lavagens e eluídos por cromatografia de fase reversa na segunda separação. Comparando essa técnica com 2D-HPLC, os autores constataram que, para a separação das proteínas na primeira dimensão, o uso de fitas com gradiente de pH aumentou em 13% o número de proteínas identificadas, em relação ao uso da coluna de troca catiônica.

Diante do exposto, deve ser ponderado que, embora a técnica de eletroforese bidimensional proporcione, de fato, a separação de centenas de proteínas em um único gel, apenas poucas proteínas puderam ser efetivamente identificadas por espectrometria de massas.

2.3.4 Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes

As proteínas do fluido intercelular das raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* (Gc), de controles não-inoculadas (Ni), cultivadas em condições de baixo (BP) e alto P (AP), foram separadas por eletroforese bidimensional e coradas com prata, podem ser vistas na Figura 7. A separação eletroforética revelou acúmulo induzido de três proteínas presentes somente em raízes colonizadas (Tab. 3).

Uma dessas proteínas (3) apresentou similaridade com histidina quinase, uma enzima que catalisa a fosforilação de um regulador de transcrição específico em resposta à presença de uma

substância sinal localizada extracelularmente. Essa enzima encontra-se ancorada na membrana celular, faz parte de um sistema de regulação composto por dois componentes e está envolvida no metabolismo secundário da célula (Ishizuka et al., 1992). O acúmulo dessa enzima foi maior em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P. Seu acúmulo também foi detectado em raízes colonizadas e cultivadas em condições de baixo P. Porém, seu acúmulo foi reduzido em 43% quando comparado ao de raízes cultivadas em condições de alto P. Essa proteína pode desempenhar alguma função importante no controle da simbiose micorrízica, já que foi detectada somente em plantas micorrizadas e teve seu acúmulo reduzido em função da escassez de P.

Outra proteína (2) teve acúmulo detectado somente em raízes colonizadas por *G. clarum*, porém seu acúmulo não foi alterado pelas condições de P. Essa proteína apresentou similaridade com hidrolase poliaspártica, uma enzima que pertence à família das peptidases e apresenta função de hidrolase, metalopeptidase, dimerização de proteínas e proteólises em geral. Na função hidrolase, promove a hidrólise de várias pontes (C-O, C-N, C-C) (Hiraishi et al., 2003).

A terceira proteína teve expressão diferencial (1) em raízes micorrizadas e apresentou similaridade com peroxidase. Essa proteína teve seu acúmulo induzido 5 vezes em função da deficiência de P nas plantas micorrizadas. As peroxidases participam de vários processos metabólicos essenciais incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERGET al., 1986), lignificação, oxidação de fenóis, proteção contra estresses bióticos e abióticos, incluindo defesa contra ataques de patógenos (GRISEBACH, 1981).

As peroxidases são enzimas envolvidas na destoxificação do H_2O_2 e ainda catalisam a polimerização oxidativa de fenilpropanóis para produção de lignina, contribuindo para o enrijecimento da parede celular durante a infecção fúngica. Expressão diferencial de genes codificando peroxidases específicas em raízes micorrizadas tem sido documentada (DIXON & HARRISON, 1990; SPANU & BONFANTE-FASOLO, 1988). Atividade de peroxidase também pode ser afetada pela concentração de P e isoflavonóides (FRIES et al., 1998).

Figura 7 – Separação de proteínas do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), através de eletroforese bidimensional. A: NiBP; B: NiAP; C: GcBP; D: GcAP. A focalização isoeétrica foi feita utilizando gradiente de pH linear (3-10). Coloração das proteínas foi feita com prata

Tabela 3 – Sequências de peptídeos de proteínas do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar determinadas por espectrometria de massas sequencial de fragmentos resultantes da digestão com Tripsina

Spot	Proteína provável	pI aparente	MM aparente (kDa)	Sequência com mais homologia			Peptídeos
				Nº de acesso	Espécie mais homóloga	Score	
1	Peroxidase	5,3	45,6	AAS75401	<i>Zea mays</i>	0,021	LVDSFVSSEATFR
2	poly(aspartic acid) hydrolase	6,27	19,4	BAC87877	<i>Sphingomonas sp.</i>	2,5	(K)AYAEMLK(E)
3	histidine kinase	4,7	64,2	AAQ19473	<i>Emericella nidulans</i>	2,2	FFDVVDTGK

Figura 8 - Abundância relativa das proteínas solúveis totais de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), analisadas por espectrometria de massas e indicadas na figura 7

As proteínas separadas por eletroforese bidimensional, oriundas dos mesmos tratamentos acima citados, porém coradas com coomassie blue estão representadas na figura 9, e os aminoácidos de peptídeos obtidos após digestão com tripsina das proteínas indicadas nos géis são apresentados na Tabela 4.

Embora o corante coomassie blue seja cerca de 50 vezes menos sensível que o nitrato de prata na detecção de proteínas em géis, a mudança no método de coloração fez-se necessária devido à baixa compatibilidade do corante de prata com a espectrometria de massas. Essa estratégia promoveu o aumento do número de proteínas identificadas, porém não permitiu a verificação de proteínas diferencialmente expressas no apoplasto.

Figura 9 – Separação de proteínas do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP), através de eletroforese bidimensional. A focalização isoeletrica foi feita utilizando gradiente de pH linear (3-10). Coloração das proteínas foi feita com coomassie blue G250

Tabela 4 – Sequências de peptídeos de proteínas do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar determinadas por espectrometria de massas sequencial de fragmentos resultantes da digestão com Tripsina

Spot	Proteína provável	pI aparente	MM aparente (kDa)	Sequência com mais homologia			Peptídeos
				Nº de acesso	Espécie mais homóloga	Score (%)	
1	hypothetical protein	3,4	37,1	XP_001210398	<i>Aspergillus terreus</i>	52,2	LGFFWTPR
2	hypothetical protein	5,1	65,3	XP_001192806	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	61,7	LHSLDAKR
3	hypothetical protein	4,75	66	EAS03883	<i>Oryza sativa</i>	41,6	TIDSTNKT LFR RFIVSR SVQTPWDKKAKAL
4	hypothetical protein	4,52	45,6	XP_682656	<i>Aspergillus nidulans</i>	42,4	VVTVALRL
5	Hexokinase 3	5,6	19,3	AAI00649	<i>Rattus norvegicus</i>	24,8	RLVSVSIRK
6	nucleoside-diphosphate kinase	5,79	18,1	AAF91407	<i>Lolium perenne</i>	70,5	RGLIGEIIISRF RGTFAVDIGRN RNVIHGSDSIESGKKE RGLIATIIISRF KIIGATNPLASEVGIVRG RKVIGATKPLASEPGTIRG SLVVLSPR FLASELYVEMLR VVTVLSPR
7	ABC transporter, ATP-binding protein	6,01	20,4	ZP_01171562	<i>Bacillus sp.</i>	59,2	GLTVHKFTFFDSTSGVLR RLVSVTVRK
8	Nucleoside diphosphate kinase I	5,3	18,2	P93554	<i>Saccharum officinarum</i>	29,4	RGTFAVDIGRN GLLGKWRK
9	hypothetical protein	6,9	34	YP_369701	<i>Burkholderia sp.</i>	27,8	GFTSKALLVGLQVR
10	ATP-dependent protease	6,9	33,6	YP_113050	<i>Methylococcus capsulatus</i>	24,8	VVKDLLLLK
11	hypothetical protein	5,4	33,4	NP_247388	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	12,1	KIAEKLNLISIKD

O critério utilizado para seleção das proteínas a serem submetidas às análises de espectrometria de massas foi a maior abundância dos spots detectados após eletroforese

bidimensional. Um total de onze puderam ser detectadas em apenas um tratamento: em raízes controle não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P (NIAP), conforme indicado na figura 9. Essas proteínas tiveram suas sequências determinadas por espectrometria de massas. Duas dessas proteínas (6 e 8) apresentaram homologia com proteínas citossólicas (nucleosídeo difosfato quinase). Essa proteína é uma enzima chave na síntese de nucleosídeos trifosfatos como o ATP. Boudarte et al., (2005) argumentam que, embora 100% das proteínas de apoplasto não apresentem similaridade com proteínas extracelulares, é possível que essas proteínas estejam realmente alocadas no espaço intercelular por um sistema de efluxo de proteínas ainda desconhecido.

Seis proteínas (1, 2, 3, 4, 9 e 11) foram classificadas como hipotéticas e outras duas proteínas (7 e 10) apresentaram similaridade com proteínas envolvidas no transporte de ATP.

O contato da hifa do FMA com a raiz hospedeira na superfície radicular induz a formação do apressório, o qual não se forma em raízes mortas. Esta mudança morfogenética da hifa na superfície das raízes indica que o FMA interage, primeiramente, com a parede celular da planta hospedeira (Harrison, 12005).

O apoplasto tem um papel importante em diversos processos, incluindo a sinalização intercelular, interação planta-microrganismos e no transporte de água e nutrientes (Yu et al., 2000). Os constituintes de parede celular e o fornecimento de nutrientes às raízes, influenciam diretamente a composição do fluido apoplástico, o qual pode afetar a relação planta-microrganismo (Sattelmacher, 2001). Acredita-se também, que certos constituintes das paredes das plantas quando liberados de raízes laterais através do córtex e epiderme poderiam agir como sinais ou estimulantes ao crescimento de hifas de FMAs (Nagahashi et al., 1996). Assumindo a importância do apoplasto radicular para o reconhecimento e controle do crescimento da hifa intrarradicular dos FMAs, podemos especular que o apoplasto pode conter moléculas com função sinalizadora ou reguladores do crescimento fúngico intrarradicular.

Porém, algumas dificuldades são encontradas em estudos envolvendo proteínas de apoplasto, como a baixa solubilidade de algumas proteínas, devido à interação com outras proteínas ou polissacarídeos ali presentes; as modificações pós-tradução, como a glicosilação, comumente encontrada em proteínas de parede; e o terceiro obstáculo que é a possibilidade de contaminação com proteínas de diferentes compartimentos subcelulares (Boudart et al., 2005).

Estudos recentes com proteoma de parede celular de plantas e fungos têm mostrado a presença de proteínas de parede bem conhecidas, de proteínas não conhecidas como sendo de parede celular e proteínas de reconhecidamente citossólicas, como enzimas glicolíticas, fatores de transcrição, entre outras (Pitarch et al., 2002; Chivasa et al., 2002; Borderies et al., 2003).

Baseados em estudos prévios de proteomas de células em suspensão e de fluido apoplástico de folhas de *Arabidopsis thaliana* (Carpin et al., 1999; Carpin et al., 2001), Bourdart et al. (2006) esperavam encontrar quantidades expressivas de peroxidases em rosetas do mesmo modelo vegetal. No entanto, das mais de cem proteínas identificadas nesse trabalho nenhuma teve similaridade com peroxidases. Os autores especularam que em contraste com peroxidases de folhas e de suspensão celular, as peroxidases do fluido apoplástico de rosetas poderiam ter menor solubilidade ou ainda estarem fortemente ligadas à parede celular por sítios de ligação de Ca (Carpin et al., 2001). Outra explicação seria a produção endógena dessas peroxidases e baixa taxa de liberação para o meio extracelular, evidenciando maior concentração citossólica do que apoplástica (Marco et al., 1999).

Em estudos de mapeamento de genes relacionados ao metabolismo de parede celular de vários tecidos vegetais de cana-de-açúcar, Lima et al (2001) verificaram cerca de 3,5% do total de genes estudados sendo expressos em raízes. Quando o mapeamento foi feito categorizando os genes, independentemente do tecido vegetal, peroxidases apresentaram alta frequência. Este modelo de expressão é consistente com órgãos onde a formação de tecidos vasculares é mais intensa (Lima et al., 2001).

2.3.5 Atividades de Guaiacol Peroxidases (GPX)

As atividades de guaiacol peroxidases foram determinadas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo e alto P, quatro, seis e oito semanas após a inoculação (Fig. 10). As atividades de GPX foram 2,3 vezes maiores em raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P, quando comparadas a atividades de raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P de plantas colhidas quatro semanas após o transplante. Oito semanas após transplante, essa diferença aumentou para 3,5 vezes. As raízes colonizadas e cultivadas em condições de baixo P, apresentaram aumento de 1,5 vezes nas atividades de GPX, quando foram comparadas as épocas de 4 e 8 semanas após a inoculação. A atividade da GPX de raízes colonizadas e cultivadas em condições de baixo P, só não foi maior

do que a atividade de GPX de raízes não inoculadas e cultivadas em condições de baixo P, determinada oito semanas após transplântio.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lambais et al. (2003), onde foi verificada maior atividade de GPX dez semanas após transplântio em raízes não-inoculadas quando comparadas com raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P.

Figura 10 – Atividade específica de Guaiacol Peroxidasas em raízes de cana-de-açúcar, quatro, seis e oito semanas após inoculação com *Glomus clarum*, em condições de baixo ou alto P. (●) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (○) Não-inoculadas e cultivadas em alto teor de P; (▼) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (▽) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P. Médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média

As atividades de GPX do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar oito semanas após a inoculação também foram determinadas (Fig. 11). A maior atividade de guaiacol peroxidase de fluido intercelular foi verificada em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em baixo teor de P. Esse comportamento de atividade de GPX oito semanas após inoculação não foi verificado em extratos protéicos totais de raízes de cana-de-açúcar. Porém, apresenta

correlação positiva com acúmulo de peroxidase apoplástica encontrada em raízes através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

A mesma correlação de atividades e acúmulo de GPX, comparadas entre os resultados encontrados por espectrometria de massas e atividade enzimática, não foi verificada em raízes colonizadas e cultivadas em condições de alto P. A atividade enzimática de GPX desse tratamento foi menor do que a atividade de raízes não-colonizadas cultivadas tanto em condições de baixo como alto P.

São encontrados poucos dados na literatura referentes à atividade enzimática de GPX apoplástica em resposta à inoculação micorrízica (Córdoba-Pedregosa et al., 2005). No entanto, alguns trabalhos relatam a diminuição da atividade de GPX de extratos protéicos total em raízes não-inoculadas quando comparadas com raízes micorrizadas e cultivadas em condições de baixo P (Lambais et al., 2003; Magalhães, 2002; Fries et al., 1996).

Figura 11 – Atividade específica de Guaiacol Peroxidases do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar oito semanas após inoculação com *G. clarum*, em condições de baixo ou alto P. (NiBP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (NiAP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P; (GcBP) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (GcAP) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P. Dados representam médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média

Para determinar a quantidade de isoformas de GPX presentes nas raízes de cana-de-açúcar foi avaliada a atividade enzimática em PAGE não desnaturante. O perfil enzimático da separação eletroforética de GPX de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* (Gc), cultivadas em baixo (BP) e alto teor de P (AP) e raízes não-inoculadas (Ni) utilizadas como controle, colhidas quatro, seis e oito semanas após transplante, é demonstrado na Figura 12A. A separação revelou a existência de seis isoenzimas em todos tratamentos.

Figura 12 – Revelação da atividade de Guaiacol Peroxidase em raízes de cana-de-açúcar (A) e fluido intercelular (B). 1: Não inoculadas e cultivadas em baixo teor de P (NiBP); 2: Não inoculadas e cultivadas em alto teor de P (NiAP); 3: Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em baixo teor de P (GcBP); 4: Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto teor de P (GcAP). Quantidades iguais de proteínas foram usadas para cada ensaio (200µg em A; 100 µg em B)

A primeira isoforma não apresentou alterações de intensidade relativa significativas tanto em resposta ao efeito dos fatores nível de P, micorriza e tempo como em resposta à combinação dos três fatores. A intensidade dessa isoforma representa entre 7 e 9,8% da intensidade total das isoformas detectadas nesse ensaio (Fig.13).

Figura 13 – Intensidade relativa de atividades das seis isoformas de GPX de raízes de cana-de-açúcar reveladas em PAGE não desnaturante quatro, seis e oito semanas após transplante, conforme indicadas na fig.12A. (NiBP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (NiAP) não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P; (GcBP) inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (GcAP) inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P

A isoforma seguinte apresentou maior intensidade nas raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo e alto P e em raízes inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P. A intensidade dessa isoforma não variou com o tempo e foi sempre menor em raízes colonizadas e cultivadas em condições de alto P. A maior intensidade verificada nessa isoforma representou 15% da intensidade de todas as isoformas.

Na terceira isoforma foi verificada uma menor intensidade em raízes inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P, quando comparada aos demais tratamentos nos três tempos de avaliação. A única variação verificada nos demais tratamentos foi a diminuição da intensidade dessa isoforma em raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P na avaliação realizada seis semanas após o transplante.

A intensidade relativa da quarta isoforma de raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P foi menor quatro semanas após transplante, quando comparada à

intensidade dessa isoforma dos demais tratamentos. Porém, quando avaliada seis e oito semanas após transplante, a intensidade da isoforma desse mesmo tratamento atingiu o mesmo nível de intensidade da isoforma dos demais tratamentos.

A quinta isoforma representou entre 22 e 28% da intensidade total das seis isoformas detectadas por PAGE não desnaturante. A intensidade dessa isoforma em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo e alto P diminuiu ao longo dos períodos de avaliação, sugerindo que esta isoforma possa estar diretamente envolvida no controle da colonização micorrízica em raízes de cana-de-açúcar.

Já a sexta isoforma apresentou intensidade semelhante entre tratamentos de uma mesma época de avaliação e diminuição da intensidade na sexta e oitava semanas após inoculação com *G. clarum*. Esta isoforma, também pode estar diretamente envolvida no controle da colonização micorrízica. A variação de intensidade foi de 15 a 21% da intensidade total das isoformas.

Através da atividade de guaiacol peroxidase do fluido intercelular das raízes de cana-de-açúcar em PAGE não desnaturante puderam ser detectadas três isoformas em todos tratamentos experimentais (Fig. 12B). Embora a atividade de GPX do fluido intercelular tenha sido relativamente baixa, foi observada maior intensidade das três isoformas (1, 2 e 3) presentes em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P.

A análise de densitometria dessas isoformas é mostrada na figura 14. A isoforma 1 teve maior intensidade verificada em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P. A intensidade dessa isoforma também foi observada em raízes colonizadas e cultivadas em condições de alto P, embora menor do que em raízes colonizadas e cultivadas em condições de baixo P. Nos demais tratamentos, de raízes não inoculadas e cultivadas em condições de baixo ou alto P, a intensidade foi semelhante.

A segunda isoforma foi a que apresentou maior intensidade entre as três isoformas reveladas pela atividade de GPX em PAGE não desnaturante, e também teve a intensidade maior verificada em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P. Embora a isoforma 3 tenha apresentado menor intensidade do que as demais isoformas, foi verificado o mesmo comportamento de intensidade entre os tratamentos.

Figura 14 – Intensidade relativa de atividades das três isoformas de GPX do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar reveladas em PAGE não desnaturante oito semanas após transplântio, conforme indicadas na fig.12B. (NiBP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (NiAP) não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P; (GcBP) inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (GcAP) inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P

Diante dos resultados apresentados, pode-se inferir que há diferenças entre as atividades de GPX do extrato protéico total de raízes e as atividades de GPX apoplástica.

Estudando raízes de alho, Córdoba-Pedregosa et al (2005) observaram diferenças entre o nível de atividade de peroxidases apoplásticas e simplásticas. A atividade de GPX apoplástica representou cerca de 3% da atividade total de Guaiacol peroxidase de simplasto.

Raízes de feijão colonizadas por *G. clarum* em condições de baixo teor de P mostraram uma indução transiente na atividade de GPX seguida por supressão (Lambais et al., 2003). O mesmo perfil de expressão foi observado por peroxidase em alho poró colonizado por *G. mosseae* (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988) e milho colonizado por *G. intraradices* (Fries et al., 1996) e sugere a ativação de respostas de defesa iniciais em MA, e a existência e mecanismos ativos para suprimí-las. A indução da atividade de Ascorbato peroxidase durante os estágios iniciais do desenvolvimento da MA *Nicotiana tabacum*-*G. mosseae*, coincidindo com a diferenciação do apressório corroboram essa hipótese (Blilou et al., 2000). O P deve, de alguma forma, desempenhar um papel também no controle da expressão de peroxidases em MAs. Tem sido mostrado que atividade total de peroxidases em raízes de milho colonizadas por FMAs são

maiores em altas concentrações de P do que em baixas (Fries et al., 1998). Altas doses de P também promoveram a atenuação da atividade de peroxidase em raízes de feijão colonizadas por *G. clarum* comparadas com raízes cultivadas em baixo teor de P (Lambais et al., 2003). Porém, outras enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) apresentaram comportamento inverso. Diante disso, os autores sugeriram que a nutrição de P é essencial para o controle da expressão de peroxidases, embora os mecanismos não sejam conhecidos.

Peroxidases, incluindo GPX, estão envolvidas na polimerização oxidativa de fenilpropanóis para a produção de lignina e a ligação de proteínas da parede celular, contribuindo para o enrijecimento da parede celular vegetal durante a penetração fúngica (Lamb & Dixon, 1997; Mittler, 2002).

2.3.6 Atividades de Ascorbato Peroxidases (APX)

As atividades de ascorbato peroxidases (APX) foram determinadas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo e alto P, quatro, seis e oito semanas após a inoculação (Fig. 15).

Muito embora os valores do nível das atividades tenham sido distintos, as raízes de cana-de-açúcar apresentaram um padrão de atividade de APX semelhante, com aumento na sexta semana de avaliação seguido de decréscimo na oitava semana, exceto em raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P (Fig. 15).

Numa escala temporal, as atividades de APX foram 2,7 vezes maiores em raízes colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P da quarta para a sexta semana e 4,4 vezes menor da sexta para a oitava semana, havendo diminuição de 1,6 vezes da quarta para a oitava semana. A diferença de atividade de APX entre raízes inoculadas com *G. clarum* e não-inoculadas, ambas cultivadas em condições de baixo P, diminuiu de 2,6 vezes para 1,6 vezes entre a quarta e oitava semana. Esses resultados fornecem indícios de que a micorrização diminui a atividade de APX em condições de baixo P, quando comparadas às raízes controle não-inoculadas.

As atividades de APX de raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P aumentaram 1,05 vezes e 1,2 vezes da quarta para a sexta semana e da sexta para a oitava semana, respectivamente. E a diferença de atividade de APX entre raízes não-inoculadas e

colonizadas por *G. clarum*, ambas cultivadas em condições de alto P aumentaram de 1,1 vezes na quarta semana para 1,2 vezes na oitava semana.

Atividade APX de raízes

Figura 15 – Atividade específica de Ascorbato Peroxidases em raízes de cana-de-açúcar, quatro, seis e oito semanas após inoculação com *Glomus clarum*, em condições de baixo ou alto P. (●) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (○) Não-inoculadas e cultivadas em alto teor de P; (▼) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (▽) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P. Médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média

As atividades de APX também foram determinadas no fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo e alto P oito semanas após a inoculação (Fig. 16).

Raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P apresentaram as maiores atividades de APX em relação aos demais tratamentos. A atividade de APX do fluido intercelular das raízes inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto teor de P foi, em média, o dobro da atividade dos demais tratamentos. As raízes não-inoculadas e as colonizadas por *G. clarum*, ambas cultivadas em condições de baixo P, apresentaram atividades de APX semelhantes, e foram 1,25 vezes menor que a atividade de APX verificada em raízes não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P.

Figura 16 – Atividade específica de Ascorbato Peroxidasas do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar oito semanas após inoculação com *G. clarum*, em condições de baixo ou alto P. (NiBP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P; (NiAP) Não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P; (GcBP) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P; (GcAP) Inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de alto P. Dados representam médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do desenvolvimento das MAs é limitado. Acredita-se que a simbiose possua mecanismos auto-regulatórios, onde o nível de infecção pode ser restringido à medida que a disponibilidade de P aumenta, de maneira que o benefício líquido da simbiose seja mantido. Lambais (1996) sugere que genes de defesa vegetal estejam envolvidos durante a formação de MAs e os classificam em

quatro categorias, dentre as quais, peroxidases estão inseridas na categoria dos genes que codificam proteínas envolvidas no aumento da rigidez da parede celular vegetal. Em estudos posteriores, Lambais et al (2003) avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes, dentre elas a peroxidase, e observaram que ocorre aumento da atividade em raízes de feijão colonizadas por FMAs, e que este aumento é maior em raízes cultivadas em baixo teor de P.

Os resultados das atividades de APX de raízes e do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar não apresentam correlação positiva. Córdoba et al (2005), estudando raízes de alho colonizadas por FMAs, observaram que existe diferenças nas atividades de APX de raízes quando comparadas com atividades de APX apoplásticas.

2.3.7 Extração de RNA e amplificação do DNA e cDNA por PCR

Para confirmar a integridade do RNA e determinar a ocorrência de possíveis contaminações por DNA genômico, os RNAs foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1%. Na Figura 17 é apresentado o perfil de RNA total extraído de raízes de cana-de-açúcar.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose 1% da extração do RNA de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) e inoculadas com *G. clarum* (Gc), cultivadas em baixo (BP) e alto teor de P (AP) após tratamento com DNase. Três repetições vegetais foram utilizadas para a extração do RNA

Na Figura 18 estão representados os produtos da amplificação por RT-PCR dos cDNAs de raízes e por PCR do DNA de folhas de cana-de-açúcar utilizando iniciadores específicos para o gene POX1. O tamanho do produto amplificado do cDNA é de 468 pb e do DNA 600 pb.

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1% da síntese do cDNA de raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) e inoculadas com *G. clarum* (Gc), cultivadas em baixo (BP) e alto teor de P (AP). Foram utilizadas 3 diluições do pool de cDNA e o DNA genômico como controle. Três repetições vegetais foram utilizadas para esta amplificação

Estes produtos foram utilizados para a clonagem em vetor pGEM T easy (Promega) e sequenciados. As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foram comparadas com as sequências de bancos de dados públicos (TIGR e NCBI). As sequências de maior similaridade desses dois bancos de dados foram alinhadas com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do clone POX1 e estão representadas nas figuras 19 e 20, respectivamente. As regiões marcadas de cinza claro nas figuras representam o tamanho do clone seqüenciado, e em cinza escuro, a sequência de nucleotídeos determinada por espectrometria de massas.

Peroxidase	1	-----
Milho	1	-----GCGGCCTCGGCTACAAGGTGCCGTCCG
Cana	1	CCTTCGCAGCGAGGGACAGCGTTGTGCTCACCGGTGGCCTCGGCTACCAGGTGCCATCCG
consensus	1	g ggccctcggtac aggtgccgtccg
Peroxidase	1	-----
Milho	28	GACGCCGTGACGGCCGGATATCCAATGCCACGCAGGCCCTGAACGAGCTGGCCCCCGGCC
Cana	61	GACGCCGTGACGGCCGGATATCCAATGCCACTCAGGCCCTGAGCAACCTA--CCTCCGCC
consensus	61	gacgccgtgacggccggatatccaatgccac caggccctgaacga ctg cc c gcc
Peroxidase	1	-----CTTTGCCTCCAAGAACCTCAGTATTGAGGA
Milho	88	CTTCTTCAACGCCACCAACTCGTCGACAACCTTCGCCTCCAAGAACCTCAGCCTCGAGGA
Cana	119	GTTTTTCAATGCCACCAACTGGTAAACAACCTTTGCCTCCAAGAACCTCACCTTGAGGA
consensus	121	tt ttcaa gccacccaact gt gacaaCTTtGCCTCCAAGAACCTCAgccTtGAGGA
Peroxidase	31	CTTGGTCGTCCTCTCCGGCGCGCACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCAGCTTCGCCGG
Milho	148	CATGGTTGTCTCTCCGGCGCACACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCAGCTTCGCCGG
Cana	179	CATGGTCGTCCTCTCCGGCGCGCACACCCCTCGGCGTCTCCCACTGCAGCAGCTTCGCCGG
consensus	181	CaTGGTcGTCTCTCCGGCGCaCACACCaTCGGCGTCTCgCACTGCAGCAGCTTCGCCGG
Peroxidase	91	AATTGGCAACCAGGGCGACCGGCTCTACAACCTTCAGCGGCTCAGCTGACGGGATTGACCC
Milho	208	AATTAACAACACAGGCGACCGGCTCTACAACCTTCAGTGGCTCATCCGACGGGATTGATCC
Cana	239	AATTGGCCAACGGGGCGACCGGCTCTACAACCTTCAGTGGCTCAGCAGACGGGATTGATCC
consensus	241	AATTgCaAccagGGCGACCGGCTCTACAACCTTCAGtGGCTCAgC GACGGGATTGATCC
Peroxidase	151	CGCGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTCTCTCTCAAGAGCATCTGCCCCGTCCAACAGCAGCCA
Milho	268	TGCGCTGAGCAAAGCCTACGCGTTCTCTCTCAAGAGCATTTGCCCCGTCAAACAGCGGCCG
Cana	299	GGCGCTGAGCAAAGCCTACGCGTTTCTCTCTCAAGAGCATCTGCCCCGTCCAACAGCAGCCA
consensus	301	GCGCTGAGCAAAGCCTACGCgTtCTCTCTCAAGAGCATcTGCCCCGTcAACAGCaGCCA
Peroxidase	211	GTTCTTCCCCAACACGACGGTGTTTCATGGACCTCATCACGCCGGAAGGGTTCGACAACAA
Milho	328	GTTCTTCCCCAACACGACGACGTTTCATGGACCTCATCACGCCGGCAAGTTCGACAACAA
Cana	359	GTTCTTCCCCAACACGACGACGTTTCATGGACCTCATCACGCCGAAAAGTTCGACAACAA
consensus	361	GTTCTTCCCCAACACGACGacGTTTCATGGACCTCATCACGCCGaaaaGTTTCGACAACAA
Peroxidase	271	GTA CTACGT CGGCCTGACCAACAACCTGGGGCTCTTCAAATCAGATGTGGCGCTGCTGAC
Milho	388	GTA CTACGT CGGCCTCACCACAACCTGGGCCTCTTCGAGTCGACGCGGCCTGCTGAC
Cana	419	GTA CTACGT CGGCCTCACCATAACCTCGGCCTCTTCACGTGCGACGCGGCACTGCTCAC
consensus	421	GTA CTACGT CGGCCTcACCAAcAACCTgGGcCTCTTCaagTCgGAcGcGGCgCTGCTgAC
Peroxidase	331	CAACGCAACGATGAAGGCGCTGGTCGACTCCTTCGTGAGCAGCGAGGCGACTTTTAGGAC
Milho	448	CAACGCAACCATGAAGGCGCTGGTCGACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCCACGTGGAAGAC
Cana	479	CAACGCGACGATGAAGGCGCTGGTCGACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGAAATGGAAGAG
consensus	481	CAACGCaACgATGAAGGCGCTGGTCGACTCCTTCGTGcGCAGCGAGGCgAcgTggAaGAc
Peroxidase	391	CAAGTTTGCCAGGTCCATGCTCAAGATGGGGCAGATCGAGGTGCTCACGGGGACGCAGGG
Milho	508	CAAGTTGCGCAAGTCCATGCTCAAGATGGGGCAGATCGAGGTGCTCACGGGGACGCAGGG
Cana	539	CAAGTTTGCCAAGTCCATGATCAAGATGGGGAAGATCGAGGTGCTCACGGGGACACAGGG
consensus	541	CAAGTTtGCCAaGTCCATGcTCAAGATGGGGcAGATCGAGGTGCTCACcGGGACgCAGGG
Peroxidase	451	CGAGATCAGGCGCAACTG-----
Milho	568	CGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCATCAACCCTGCTAATGCCGCCGCCGACGTCGTCCT
Cana	599	CGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCATCAACCCTGCTAATGCCGCTGCCGATGTTCTC--
consensus	601	CGAGATCAGGCGCAACTGcagggtcatcaaccctgctaattgccgc gccga gt tc

```

Peroxidase -----
Milho      628 TGCCCGTCAGCCAGGTTTCATCAGGATCCACTGGAGTGGCTACAAGCTAACCATATC-----
Cana      657 -GGCCGTCGATCAGGTTCTTCAGGATTCAGTGGAGTGGCTGCAAGCTAACCATACCGGTT
consensus 661 g ccgtcag caggttc tcaggat cactggagtggtacaagctaaccata c

Peroxidase -----
Milho      684 -----TCGGTGTGTCTGCAGTGTGTTT---GGTGTGGGATGTGATATAGTATATTGCAAT
Cana      716 GTCAGTACATGTGCGCGCAGTGTGTGTTTGGGTGTGGGATGTGATATTGCAATAAGTAAT
consensus 721 t gtgtg gcagtggt t ggtgtgggatgtgatat g a g aat

Peroxidase -----
Milho      736 AATTTAGAAAAC-TGAAGAAGAAGCAGGTGATGACCACACTTTGT-AGTGCATCACGCGG
Cana      776 GAACGAATTAGCTTGAATAACTAGCTTGCTACATGAACACGGAGACAGCACAATAACCTA
consensus 781 aa ag aact gaa aa agc g a g acac g ag gca a c g

Peroxidase -----
Milho      794 TGCGTGTTTCATTTAACCGTGGCGTTTGATTGTGAGGATGAAATAAAACACATGTATGACC
Cana      836 AAAAACTGGAGAAAAAGGGAGGATCACCTCTGTTGACCTTAACGCGGGTCATTTTGACT
consensus 841 g g t a aa g gg gt t tg ga a a a a t tgac

Peroxidase -----
Milho      854 ACATCTGATTATTAGTGATACAAAAAACTTGATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Cana      896 GG-TGGGGTGATTGGGGAGAGTAATAAA-CTGGGCCCCAACCTCTTTTTT-----
consensus 901 a t gat attag ga a aa aaa ct ga aaa

```

Figura 19 – Análise comparativa da sequência de nucleotídeos do clone POX1 de cana-de-açúcar codificando uma peroxidase putativa induzida pela micorrização com sequências de peroxidases similares de bancos de dados públicos

Peroxidase	1	-----
Cana	1	-----
milho	1	TKRHCLRFTTVLATLLSATAACLDVGFDYDRTCPTAETIVQQTVAAAFRRNNSGVAPALIR
consensus	1	
Peroxidase	1	-----
Cana	1	-----
milho	61	MHFHDCFVRGCDGSVLIDTVGNLTAEKDAPPNNPSLRFFDVVDRAKASLEAQCPGVVSCA
consensus	61	
Peroxidase	1	-----FASKNLS
Cana	1	----FAARDSVVLTGGLGYQVPSGRRDGRISNATQALSNNLPPPPFNATQLVNNFASKNLT
milho	121	DVLAFAARDSVVLSSGGLGYQVPAGRRDGRISNDTEALNNLPPPPFNATELADRFASKNLS
consensus	121	faardsvvlTGGLGYQVP grrdgrisn t al nlppppfnat l FASKNLS
Peroxidase	8	IEDLVVLSGAHTIGVSHCSSFAG---IGNQGDRLYNFSGSADGIDPALS KAYAFLLKSIC
Cana	57	LEDVVLSGAHTLGVSHCSSFAG---IGQGDRLYNFSGSADGIDPALS KAYAFLLKSIC
milho	181	IEDLVVLSGAHTIGVSHCSGFAGPTDLNGPVDRLYNFS-SPDGIDPTLSKAYAFLLKSIC
consensus	181	iEDLVVLSGAHTiGVSHCSsFAG ign gDRLYNFSgSaDGIDPaLSKAYAFLLKSIC
Peroxidase	65	PSNSSQFFPNTTVFMDLITPEGFDNKYYVGLTNNLGLFKSDVALLTNATMKALVDSFVSS
Cana	114	PSNSSQFFPNTTTFMDLITPEKFDNKYYVGLTNNLGLFTSDAALLTNATMKALVDSFVRS
milho	240	PANTSQFFPNTTVFMDLITPERFDNKYYVGLTNNLGLFKSDVALLTNATMKALVDSFVRS
consensus	241	PsNsSQFFPNTTvFMDLITPEkFDNKYYVGLTNNLGLFkSDvALLTNATMKALVDSFVrS
Peroxidase	125	EATFR TKFTR SMLKMGI EVLTGTQGEIRRN-----
Cana	174	EAKWKS KFAKSMIKMGKIEVLTGTQGEIRRNCRVINPANAAADVLGRRSGSSGFTGVAAA
milho	300	EATFR TKFARSMIKMGQIEVLTGTQGEIRRNCRVINPVSATDDVVLAR--PSGFTGVAAAS
consensus	301	EAtfrtKFarSMiKMGqIEVLTGTQGEIRRNcrvinp a dvl r sgftgvaa
Peroxidase		-----
Cana	234	NHTGCQYMWRSVCLGVGCDIAISNERISLNNXACYMNTETAQXPKKLEKKGGSPSVDLNA
milho	358	-----
consensus	361	
Peroxidase		-----
Cana	294	GHFDWWGDWGE
milho		-----
consensus	421	

Figura 20 – Análise comparativa da sequência de aminoácidos do clone POX1 de cana-de-açúcar codificando uma peroxidase putativa induzida pela micorrização com sequências de peroxidases similares de bancos de dados públicos

2.3.8 Análise da expressão do gene POX1 por qPCR

As análise de expressão do gene POX1 foram feitas por PCR quantitativo, utilizando-se o programa REST. Nesta análise, é estimada a expressão do gene alvo do estudo por contrastes com gene de baixa variação de expressão no órgão ou tecido quando submetidos às mesmas condições experimentais do gene alvo (Andersen et al., 2004; Pfaffl et al., 2002). Para o nosso trabalho foi utilizado como controle constitutivo o gene da ubiquitina (UbiQ) por apresentar baixa variação de expressão em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas cultivadas em diferentes teores de P em estudos prévios (Oliveira et al., 2005).

A avaliação da expressão do gene POX1 e ubiquitina de raízes de cana-de-açúcar estão representadas na Figura 21.

Figura 21 – Nível de expressão de transcritos de peroxidase (Perox) e ubiquitina (UbiQ) em raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas (Ni) ou colonizadas por *Glomus clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (20 mg de P kg⁻¹substrato) (BP) ou em condições de alto P (200 mg de P kg⁻¹substrato) (AP)

Primeiramente foi avaliado o efeito da micorrização em plantas cultivadas em baixo teor de P (GcBP/NiBP). Essa avaliação indicou que a expressão da peroxidase em raízes de cana-de-açúcar cultivadas em baixo teor de P não diferiu estatisticamente pelo efeito da inoculação com *Glomus clarum*. Esse fato pode ocorrer naturalmente, se for levado em consideração o aumento da expressão de peroxidases tanto em raízes submetidas a condições de escassez de P como em raízes jovens de plantas micorrizadas.

O efeito do baixo nível de P em relação ao alto nível de P em raízes de cana-de-açúcar não inoculadas (NiBP/NiAP) não demonstrou diferença significativa da variação da expressão do gene POX1.

A análise de expressão comparativa do gene POX1 em função da colonização com *G. clarum* de raízes de plantas cultivadas em condições de alto P em relação a raízes não-inoculadas cultivadas nas mesmas condições de P (GcAP/NiAP) demonstrou que a expressão da peroxidase diminuiu 3,95 vezes. Esse resultado confirma a diminuição da expressão da peroxidase em raízes cultivadas em alto teor de P pelo efeito da colonização micorrízica.

Contrariamente, a análise da expressão do gene POX1 em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em função do aumento do nível de P (GcBP/GcAP) mostrou indução desse gene. Essa indução resultante da diminuição do total de P fornecido às plantas colonizadas foi da magnitude de 6,83 vezes.

A técnica de qPCR permitiu avaliar o nível de expressão relativa dos transcritos de RNA de peroxidase, usando como gene de referência a ubiquitina.

Técnicas de qPCR têm sido amplamente utilizadas em plantas de cana-de-açúcar para quantificação do vírus do amarelinho (Korimbocus et al., 2002; Gonçalves, 2005; Schaad e Frederick, 2002). Porém, estudos de expressão de peroxidases em raízes de cana-de-açúcar ainda são escassos (Kurama et al., 2002). Neste trabalho que foi realizado com pesquisa de enzimas envolvidas na desintoxicação de espécies reativas de Oxigênio em diferentes tecidos de cana-de-açúcar, os autores encontraram quatro isoformas semelhantes a glutational peroxidase de *Hordeum vulgare*, e duas isoformas de peroxidases de cana-de-açúcar apresentaram semelhanças a peroxidases de trigo. Esses transcritos aumentam seu nível de expressão quando submetidos a condições de estresse como salinidade, ou infecção por patógenos (Hess et al., 1998). Outra isoforma apresentou similaridade com peroxidase de arroz, incluindo peroxidases de raízes induzidas pela inoculação com *Acetobacter diazotrophicans*. Em muitas espécies de plantas tem

sido observado o aumento dos transcritos de peroxidases em condições de estresse salino (Holland et al., 1993) e tecidos infectados por bactérias ou fungos patogênicos (Levine et al., 1994).

A explosão oxidativa é uma das armas mais poderosas que as plantas possuem para a defesa contra o ataque dos patógenos. Nas interações planta-patógeno, o desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade está associado com a explosão oxidativa, gerando espécies ativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Low; Mérida, 1996; Medhy, 1994).

Apesar do peróxido de hidrogênio ser uma espécie reativa de oxigênio, ele também pode atuar como molécula sinalizadora nas plantas, desencadeando respostas de defesa como a indução sistêmica de genes de defesa, a morte celular programada das células elicitadas e o reforço da parede celular (Neill et al., 2002). Os mecanismos de destoxificação das espécies ativas de oxigênio envolvem diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia, e, sob condições de estresses, as espécies ativas de oxigênio podem se acumular nos tecidos ou organelas resultando na alteração da atividade dessas enzimas responsáveis pela proteção antioxidante e preservação da integridade da célula (Lagriffoul et al., 1998). Os níveis de estresse oxidativo celular são determinados pelas quantidades de óxidos e peróxidos de hidrogênio, que pode ser diretamente metabolizado pelas peroxidases, particularmente aquelas da parede celular (Polidoros e Scandalios, 1999).

Os mecanismos utilizados pela micorriza para amenizar situações de estresse são pouco conhecidos, mas sabe-se que estão relacionados com a expressão de várias enzimas antioxidativas. Sabe-se que FMAs promovem a extrusão de biomoléculas, modificam enzimas extracelulares e de raízes, incluindo a atividade de peroxidase (Salzer et al., 1999). Spanu & Bonfante-Fasolo (1988), em estudo de raízes de alho poró, observaram um incremento da atividade enzimática nas etapas iniciais da colonização micorrízica por *G. versiforme*. Após o estabelecimento da colonização micorrízica, a atividade enzimática em plantas micorrizadas diminuiu (Fries et al., 1996; Magalhães, 2002).

Avaliando a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, Lambais et al (2003) observaram resultados semelhantes do aumento da atividade em raízes de plantas na fase inicial da colonização por FMAs e cultivadas em baixo teor de P, seguido da diminuição da atividade em fases que a simbiose encontrava-se estabelecida.

Em trabalhos envolvendo expressão gênica de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* em condições de baixo e alto teor de P (Takahashi, 2005) observou a indução da expressão de um gene codificando uma peroxidase durante a micorrização, sendo que em condições de alto teor de P ela foi menos expressa quando comparada com condições de baixo teor de P. Em plantas cultivadas em baixo teor de P essa enzima teve sua expressão aumentada em 1,4 vezes em relação a plantas não colonizadas.

Expressão de peroxidases em raízes de plantas hospedeiras deve de alguma forma regular e limitar o crescimento do simbionte. Durante a fase inicial de infecção, a produção de espécies ativas de Oxigênio pode induzir a expressão de peroxidases. A produção de espécies ativas de Oxigênio também pode deixar as paredes celulares mais maleáveis e facilitar a penetração das estruturas fúngicas. Durante o tempo de colonização e desenvolvimento da simbiose é também possível que peroxidases relacionadas à defesa sejam expressas para limitar a expansão fúngica, mas também proteger a planta contra patógenos da microbiota do solo, através do estabelecimento de um ambiente altamente tóxico pela produção de espécies ativas de Oxigênio.

Esses dados sugerem que um limite de colonização fúngica eleva a produção de peróxidos de hidrogênio e demais espécies ativas de oxigênio, com consequente aumento da atividade de enzimas antioxidantes, incluindo peroxidases em resposta à colonização fúngica. E ainda que a soma desses fatores possam controlar o crescimento fúngico intrarradicular. Ainda é possível sugerir, baseados nessas informações aqui geradas, que experimentos futuros com plantas alteradas para a expressão do gene codificante para peroxidase em cana-de-açúcar ou mesmo possam elucidar a essencialidade ou o papel efetivo desempenhado pela peroxidase na simbiose micorrízica arbuscular.

3 CONCLUSÕES

- As atuais técnicas de proteômicas, apesar de serem poderosas ferramentas no estudo de interações planta-microrganismos, mostraram pouca eficiência no tocante identificação em massa de proteínas diferencialmente expressas em membrana plasmática, fluido intercelular e proteínas totais da interação micorriza arbuscular cana-de-açúcar
- A identificação da peroxidase apoplástica através de géis bidimensionais e espectrometria de massas forneceu suporte para a caracterização dessa proteína por atividade enzimática, a qual revelou maior resposta em raízes colonizadas e cultivadas em baixo nível de P, sendo coerente com os resultados encontrados por proteômica.
- A expressão do gene que codifica para peroxidase, avaliada por PCR em tempo real mostrou resposta de expressão de transcritos semelhante em raízes cultivadas em baixo teor de P e colonizadas pelo fungo micorrízico.
- O gene que codifica para a peroxidase mostrou-se ser um potencial candidato para construção de mutantes com intuito de definir sua essencialidade na simbiose micorrízica.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 5, n. 1, p.1-53, 2006.
- AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; TAMOGAMI, S.; YONEMURA, M.; KUBO, A.; SAJI, H. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.40, p.1061-1069, 2002.
- AKIYAMA, K.; MATSUOKA, H.; HAYASHI, H. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.15, p.334-340, 2002.
- ALBRECHT, C.; BURGESS, T.; DELL, B.; LAPEYRIE, F. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. **New Phytologist**, Oxford, v.127, p.217-222, 1994.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J.A. Comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, New York, v.19, n.3/4, p.533-537, 1997.
- ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis***. 2006. 120p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARINES, J.; PALMA, J.M.; VILARIÑO, A. Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. **New Phytologist**, Oxford, v.123, p.763-768, 1993.
- ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n. 1/4, p.1-3, 2001.
- BAGO, B.; DONAIRE, J.P.; AZCÓN-AGUILAR, C. ATPases activities of root from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants. **New Phytologist**, Oxford, v.136, p.305-311, 1997.
- BARNES, A.; BALE, J.; CONSTANTINIDOU, C.; ASHTON, P.; JONES, A.; PRITCHARD, J. Determining protein identify from sieve elements sap in *Ricinus communis* L. for quadrupole time of fly (Q-ToF) mass spectrometry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1473-1481, 2004.
- BENABDELLAH, K.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Soluble and membrane symbiosis-related polypeptides associated with the development of arbuscular mycorrhizas in tomato (*Lycopersicon esculentum*), **New Phytologist**, Oxford v.140, p.135-143, 1998.

BENABDELLAH, K.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Plasma membrane ATPase and H⁺ transport activities in microsomal membranes from mycorrhizal tomato roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, p.1343-1349, 1999.

BENABDELLAH, K.; AZCON-AGUILAR, C.; FERROL, N. Alterations in the plasma membrane polypeptide pattern of tomato roots (*Lycopersicon esculentum*) during the development of arbuscular mycorrhiza. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.747-754, 2000.

BENATTI, L.B. **Vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar**: caracterização da resposta fisiopatológica de três variedades de cana-de-açúcar. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade de Campinas, Campinas, 2004.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Plant proteome analyses. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.285-298, 2003.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, .E.; GIANINAZZI, S. Proteomics as tool to monitor plant-microbe symbioses in the rhizosphere. **Mycorrhiza**, Berlin, v.14, p.1-10, 2004.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; **Electrophoresis**, New York, v.23, p.122-137, 2002.

BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; St-ARNAUD, M.; FONTAINE, B.; **Molecular Plant Microbe Interaction**, Oxford, v. , p.-, 2003.

BESTEL-CORRE,G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J.F.; van TUINEN, D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis**, New York, v. 23, p.122–137, 2002.

BLILOU, I.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. **Journal of Experimental Botany**, Oxford,v. 50, n. 340, p.1663-1668, nov 1999.

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, 2000.

BLILOU, I.; BUENO, P. ; OCAMPO, J.A.; GARCIA-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.

BODKER, L.; KJOLLER, R.; ROSENDAHL, S. Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. **Mycorrhiza**, Berlin, v.8, n.3, p.169-174, 1998.

BOISSON-DERNIER, A.; CHABAUD, M.; GARCIA, F.; BECARD, G.; **Molecular Plant Microbe Interaction**, Oxford, v. 14, p.695-700, 2001.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.189-214, 1995.

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

BONFANTE, P.; GENRE, A.; FACCIO, A.; MARTINI, I. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 13, p.1109-1120, 2000.

BORDERIES, G.; JAMET, E.; LAFITTE, C.; ROSSIGNOL, M. **Electrophoresis**, New York, v.24, p.3421-3432, 2003.

BOUDART, G.; JAMET, E.; ROSSIGNOL, M.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; JAUNEAU, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; PONT-LEZICA, R. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.212-221, 2005.

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, p.693-698, 2000.

CANDIANO, G.; BRUSCHI M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, New York, v.25, p.1327-1333, 2004.

CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p.285-298, 2004.

CARGILE, B.J.; BUNDY, J.L.; GRUNDEN, A.M.; STEPHENSON Jr, J.L. Synthesis/degradation ratio mass spectrometry for measuring relative dynamic protein turnover. **Analytical Chemistry**, Washington, v.76, p.86-97, 2004.

CATOIRA, R.; GALERA, C.; BILLY, C.; PENMETS, R.V.; **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p.1647-1665, 2000.

CELEDÓN, P.A.F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas**. 2006. 122p. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- 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, p.265-273, 2003.
- CHAMRAD, D.C.; KOERTING, G.; GOBOM, J.; THIELE, H.; KLIOSE, J.; MEYER, H.E.; BLUEGGEL, M. Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, London, v.376, n.7, p.1014-1022, 2003.
- CHANG, W.W.P.; HUANG, L.; SHEN, M.; WEBSTER, C.; BURLINGAME, A.L.; ROBERTS, J.K. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, Baltimore, v.14, p.304-313, 2002.
- CHARVET-CANDELA V, HITCHIN S, REDDY MS, COURNOYER B, MARMEISSE R, GAY G Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. **Tree Physiology**, Berlin, v.22, p.231–238, 2002.
- CHIVASA, S.; NDIMBA, B.; SIMON, W.; ROBERTSON, D. **Electrophoresis**, New York, v.23, p.1754-1765, 2002.
- COLDITZ, F.; BRAUN, H.P.; JACQUET, C.; NIEHAUS, K.; KRAJINSKI, F. Proteomic profiling unravels insights into the molecular background underlying increased *Aphanomyces euteiches*-tolerance of *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.59, p.387-406, 2005.
- CÓRDOBA-PEDREGOSA, M.C.; VILLALBA, JM.; CÓRDOBA, F.; GONZÁLEZ-REYES, A. Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.685-694, 2005.
- CORTHALS, G.L.; WASINGER, V.C.; HOCHSTRASSER, D.F.; SANCHEZ, J.C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, New York, v.21, p.1104-1115, 2000.
- CRIQUET S, JONER E, LEGLIZE P, LEYVAL C Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductase in the roots and rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Biotechnology Letters**, Boston, v.22, p.1733–1737, 2000.
- DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; RICHBERG, M.H. Dead don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1793-1807, 1996.
- DASSI, B.; SAMRA, A.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Different polypeptide profiles from tomato roots following interactions with arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae*) or pathogenic (*Pythophthora parasitica*) fungi. **Symbiosis**, Rehovot, v.26, p.65-77, 1999.

DAVIS, R.H.; TANAKA, C.K.; VENSEL, W.H.; HURKMAN, W.J.; McCORMICK, S. Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.4864-4884, 2005.

DENNY, R.; NEESON, K.; RENNIE, C.; RICHARDSON, K.; LEICESTER, S.; SWAINSTON, N.; WORROLL, J.; YOUNG, P. The use of search workflows in peptide assignment from MS/MS data. **Association of Biomolecular Resources Facilities**, ABRF'02: Biomolecular Technologies: tools for discovery in proteomics and genomics, Austin, Texas, March 9-12, 2002.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**, New York, v.28, p. 165-234, 1990.

DUMAS-GAUDOT, E.; GUILLAUME, P.; TAHIRI-ALAOU, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Changes in polypeptide patterns in tobacco roots colonized by two *Glomus* species. **Mycorrhiza**, Berlin, v.4, p.215-221, 1994.

DUMAS-GAUDOT, E.; BESTEL-CORRE, G.; GIANINAZZI, S in: PANDALAI, S.G. (Ed.). **Recent research developments in plant biology**, Trivandrum: Research Signpost, 2001. p.95-104.

DUMAS-GAUDOT, E.; AMIOUR, N.; WEIDMANN, S.; BESTEL-CORRE, G.; VALOT, B.; LENOUE, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root-fungus interactions. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.451-453, 2004.

DUMAS-GAUDOT, E.; VALOT, B.; BESTEL-CORRE, G.; RECORBET, G.; St-ARNAUD, M.; FONTAINE, B.; DIEU, M.; RAES, M.; SARAVANAN, R.S.; GIANINAZZI, S. Proteomics as a way to identify extra-radicular fungal proteins from *Glomus intraradices* –RiT-DNA carrot root mycorrhizas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p.401–411, 2004.

ESSADER, A.S.; CARGILE, B.J.; BUNDY, J.L.; STEPHENSON Jr., J.L. A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.24-34, 2005.

EZETA, F.N.; SANTO, O.M. Benefício da introdução de endomicorriza eficiente na utilização de nutrientes em solos do sul da Bahia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.9, p.13-17, 1980.

FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial agellin. **Plant Journal**, Oxford, v.18, p.265-276, 1999.

FERRO, M.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; ROLLAND, N.; CHAPEL, A.; SALVI, D.; GARIN, J.; JOYARD, J. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. **Electrophoresis**, New York, v.21, p.3517-3526, 2000.

FESTER T.; KIESS, M.; STRACK, D. A mycorrhiza-responsive protein in wheat roots. **Mycorrhiza**, Berlin, v.12, p.219-222, 2002.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **Agrianual** 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p.370-378.

FRIES, L.L.M.; PACOVSKY, R.S.; SAFIR, G.R. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, p.981-988, 1996.

FRIES, L.L.M.; PACOVSKY, R.S.; SAFIR, G.R. Influence of phosphorus and formononetin on iso enzyme expression in the *Zea mays*-*Glomus intraradices* symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.103, p.172-180, 1998.

GALVANI, M.; HAMDAM, M.; RIGHETTI, P.G. Investigating the reaction of a number of gel electrophoresis cross-linkers with lactoglobulin by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Electrophoresis**, New York, v.21, p.3684-3692, 2000.

GARCÍA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A. Regulation of plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1377-1386, 2002.

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

GIANINAZZI-PEARSON, V.; SMITH, S.E.; GIANINAZZI, S.; SMITH, F.A. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? **New Phytologist**, Oxford, v.117, p.61-74, 1991.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; ARNOULD, C.; OUFATTOLE, M.; ARANGO, M.; GIANINAZZI, S. Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. **Planta**, New York, v.211, p.609-613, 2000.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRECHENMACHER, L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic cell programme. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.82, p.1228-1234, 2004.

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1100, p.217-234, 1992.

GION, J.M.; LALANNE, C.; LE PROVOST, G.; FERRY-DUMAZET, H.; PAIVA, J.; CHAUMEIL, P.; FRIGERIO, J.M.; BRACH, J.; BARRE, A.; DE DARUVAR, A.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; SOMMERER, N.; NEGRORI, L.; PLOMOIN, C. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v.5, p.3731-3751, 2005.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; CITERNESI, A. S.; AVIO, L. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.133, 65-71, 1996.

GINZBERG, I.; DAVID, R.; SHAUL, O. et al. *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots. **Symbiosis**, Rehovot, v.25, n.1/3, p.145-157, 1998.

GLAZEBROOK, J.; CHEN, W.; ESTES, B.; CHANG, H.S.; NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J.P.; ZHU, T.; KATAGIRI, F. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, p.217-228, 2003.

GOFF, A.S. Rice as a model for cereals genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.2, p.86-89, 1999.

GOLDEBERG, R.; CATESSON, A.M.; CZANINSKI, Y. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p.267-279, 1983.

GOLDBERG, R.; LÊ, T.; CATESSON, A.M. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.36, p. 503-510, 1985.

GONÇALVES, M.C. Viroses da cana-de-açúcar: potencialidade de novas epidemias. **Biológico**, São Paulo, v.67, p.19-21, 2005.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis**, New York, v.20, p.712-717, 1999.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.3665-3685, 2004.

GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. **Plant Physiology**, Rockville, v.68, p.458-552, 1981.

GRAHAM, J.H. What do root pathogens see in mycorrhizas? **New Phytologist**, Oxford, v.149, p.357-359, 2001.

GRISEBACH, H. Lignins, In: CONN, E.E. (Ed.) **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1981. v.7. p.457-478.

GUENOUNE, D.; GALILI, S.; PHILLIPS, D.A.; VOLPIN, H.; CHET, I.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM-fungus *Glomus intraradices*. **Plant Science**, Clare, v.160, p.925-932, 2001.

GÜNTHER T, PERNER B, GRAMSS G. Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Journal Basic Microbiology**, London, v.38, p.197–206, 1998.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.19, n.3, p.1720-1730, 1999.

GYGI, S.P.; CORTHAIS, G.L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analyses technology. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.9390-9395, 2000.

HARRISON, M.J.; van BUUREN, M.L. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, London, v. 378, n. 5, p.626-629, 1995.

HARRISON, M.J. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. **Plant Journal**, Oxford, UK, v.9, n.3, p.491-503, 1996.

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

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

HARRISON, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review Microbiology**, Amsterdam, v.59, p.19-42, 2005.

HESS, W.; GOLZ, R.; BÖRNER, T. Analysis of randomly selected cDNAs reveals the expression of stress-and defence-related genes in the barley mutant albstrians. **Plant Science**, Clare, v.133, p.191-201, 1998.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, New York, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HIRAISHI, T.; KAJIYAMA, M.; TABATA, K.; ABE, H.; YAMATO, I.; DOI, Y. Biochemical and molecular characterization of poly(aspartic acid) hydrolase-2 from *Sphingomonas* sp. KT-1. **Biomacromolecules**, London, v.4, p.1285-1292, 2003.

HOLLAND, D.; BEN-HAYYIM, G.; FALTIN, Z.; CAMOIN, L.; STROSBERG, A.D., ESHDAT, Y. Molecular characterization of salt-stress associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.21, p.923–927, 1993.

IMIN, N.; KERIM, T.; ROLFE, B.G.; WEINMAN, J.J. Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. **Proteomics**, Weinheim, v.4, n.7, p.1873-1882, 2004.
ISHIZUKA, H.; HORINOUCI, S.; KIESER, H.M.; HOPWOOD D.A.; BEPPU, T. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. **Journal of Bacteriology**, New York, v.174, p.7585-7594, 1992.

JOURNET, E.P.; elGACHTOULI, N.; VERNOUD, V.; deBILLY, F.; **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 14, p.737-748, 2001.

KANG, M.K.; PARK, K.S.; CHOI, D. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. **Molecules and Cells**, London, v. 31, n. 8, p.388-392, 1998.

KHALIQ, A.; SANDERS, F.E. Effects of phosphorus application and vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and phosphorus nutrition of maize. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.20, n.11, p.1607-1616, 1997.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **Journal of Virological Methods**, New York, v.103, p.109-120, 2002.

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, p.952-962, 2003.

KRAJINSKI, F.; HAUSE, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; FRANKEN, P. Mth1, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. **Plant Biology**, New York, v.4, p.754-761, 2002.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p.325-331, 2002.

KURAMA, E.E.; FENILLE, R.C.; ROSA JR, V.E.; ROSA, D.D.; ULIAN, E.C. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. **Molecular Plant Pathology**, Standford, v.3, p.251-259, 2002.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; vanGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.200, p.241-250, 1998.

LAL, S.K.; JOHNSON, S.; CONWAY, T.; KELLEY, P.M. Characterization of a maize cDNA that complements a enolase-deficient mutant of *Escherichia coli*. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.16, p.787-795, 1991.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p.251-275, 1997.

LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS, DCF, 1996. cap.2, p.5-38.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopatological Society Press, 1999. p.46-60.

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, 2003.

LAROSE, G.; CHENEVERT, R.; MOUTOGLIS, P.; GAGNE, S.; PICHÉ, Y.; VIERHEILIG, H. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.159, p.1329-1339, 2002.

LEÓN, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant physiology**, Rockville, v. 108, p.1673-1678, 1995.

LEONE, A., et al., Membrane cell wall associated heat shock proteins in two genotypes of barley seedling. **Plant Biosystems**, Bologna, v.134, p.171-178, 2000.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-593, 1994.

LIMA, D.U.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.; MOLLE, F.R.D.; BUCKERIDGE, M.S. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, p.191-198, 2001.

LIU, H.; THIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.11, n.1, p.14-22, 1998.

LIU, J.; BLAYLOCK, L.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C.; van der BOSH, C.; HARRISON, M. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.2106-2123, 2003.

LOW, P.S.; MERIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.96, p.533-542, 1996.

MAGALHÃES, G.C. **Análise da atividade de algumas enzimas antioxidantes em plantas de soja (*Glycine Max* L.) sob níveis de manganês, em função da micorriza arbuscular**. 2002. 102p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MAJOUL, T.; BANCEL, E.; TRIBOI, E.; BEM HAMIDA, J.; BRANLARD, G.; Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.505-513, 2004.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, London, v.21, p.255-261, 2003.

MARTIN, F.; BURGESS, T.; CARNERO DIAZ, M.E.; de CARVALHO, D.; LAURENT, P.; MURPHY, P.; NEHLS, U.; TAGU, D. Ectomycorrhiza morphogenesis. Insight from studies of developmentally regulated genes and proteins. In: **Biotechnology of Ectomycorrhizae**. STOCCHI, V. New York, Ed. Plenum Press: 1995. p.54-66.

MARULANDA, A.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. **Physiologia Plantarum**, København, v.119, p.526-533, 2003.

MATHESIU, U.; IMIN, N.; NATERA, S.H.A.; ROLFE, B.G. Proteomics as a functional genomics tool. In: GROTEWOLD, E. (Ed.) **Plant Functional Genomics**. Totowa, Humana Press: 2003. p.395-413.

MEDHY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.467-472, 1994.

MÉCHIN, V.; CONSOLI, L.; le GUILLOUX, M.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, Weinheim, v.3, p.1299-1302, 2003.

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

MEDHY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.467-472, 1994.

MEIRELES, K.G.X. **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massas**. 2006. 117p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- MITCHELL RJ, GARRETT HE, COX GS, ATALAY A Boron and ectomycorrhizal influences on indole-3-acetic acid levels and indole-3-acetic acid oxidase and peroxidase activities of *Pinus echinata* roots. **Tree Physiology**, Berlin, v.1, p.1–8, 1986.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Sciences**, London, v.7, p.401-410, 2002.
- MÜNZENBERGER B, OTTER T, WÜSTRICH D, POLLE A Peroxidase and laccase activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal fine roots of Norway spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.75, p.932–938, 1997.
- NAGAHASHI, G.; DOUDS; D.D.; ABNEY, G.D. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. **Mycorrhiza**, Berlin, v.6, p.403-408, 1996.
- NAGAHASHI, G.; ABNEY, G.; DONER, L. A comparative study of phenolic acids associated with cell wall and cytoplasmic extracts of host and non-host roots for AM fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.133, p.281-288, 1996.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.22, p.867-880, 1981.
- NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1237-1247, 2002.
- NIELSEN, K.L.; INDIANI, C.; HENRIKSEN, A.; FEIS, A.; BECUCCI, M.; GAJHEDE, M.; SMULEVICH, G.; WELINDER, K.G. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. **Biochemistry**, Washington, v.40, p.11013-11021, 2001.
- NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS, DCF, 1996. cap.13, p.135-174.
- OUERGHI, Z.; RÉMY, R.; OUELHAZI, L.; AYADI, A.; BRULFERT, J. Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. **Electrophoresis**, New York, v.21, p.2487-2491, 2000.
- PAGE, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, London, v.12, p.357-358, 1996.
- PARKER, J.E. Plant recognition of microbial patterns. **Trends in Plant Sciences**, London, v.8, p.245-247, 2003.

PARRA-GARCIA, M.D.; Lo GIUDICE, V.; OCAMPO, J.A. Absence of VA colonization in *Oxalis pes-caprae* inoculated with *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.145, p.298-300, 1992.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, New York, v.24, p.255-265, 2005.

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S.P. Rice phosphate transporters include an 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, p.13324-13329, 2002.

PINIOR, A.; WYSS, U.; PICHÉ, Y.; VIERHEILIG, H. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.77, p.891-897, 1999.

PITARCH, A.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. **Molecular Cell Proteomics**, London, v.1, p.967-982, 2002.

POLIDOROS, N.A.; SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation catalases and glutathione S-transferase gene expression in mayze (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.106, p.112-120, 1999.

PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1743-1750, 2004.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochemical and Biophysical Acta**, New York, v.1469, p.31-42, 2000.

PORUBLEVA, L.; VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.; CHITNIS, P. The proteome of mayze leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptides mass fingerprints. **Electrophoresis**, New York, v.22, p.1724-1738, 2001.

PUEPPKE, S.G. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by Rhizobia. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v.16, p.1-51, 1996.

RAMOS, A.C. **Efeito da colonização micorrízica sobre a atividade de H⁺-ATPases de raízes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 107p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2001.

RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A.; FAÇANHA, A.R. Atividade ATPásica e Pirofosfatásica em microsomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.207-213, 2005.

- RAUSCH, C.; DARAM, P.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, London, v.414, p.462-466, 2001.
- REIS, V.M.; PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1933-1941, 1999.
- REPETTO, O.; BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G.; **New Phytologist**, Oxford, v. , p.555-567, 2002.
- REQUENA, N.; REUNINGER, M.; FRANKEN, P.; OCON, A. Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, p.1540-1549, 2003.
- REYMOND, P.; FARMER, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p.404-411, 1998.
- ROCCO, M.; D'AMBROSIO, C.; ARENA, S.; FAUROBERT, M.; SCALONI, A.; MARRA, M. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.3781-3791, 2006.
- ROGERS, M.; GRAHAM, J.; TONGE, R.P. Using statistical image models for objective evaluation of *spots* detection in two-dimensional gels. **Proteomics**, Weinheim, v.3, p.879-886, 2003.
- ROLFE, B.G.; MATHESIUS, U.; DJORDJEVIC, M.; WEINMAN, J.; HOCART, C.; WEILLER, G.; BAUER, W.D. Proteomic analysis of legume-microbe interactions. **Comparative and Functional Genome**, New York, v.4, p.225-228, 2003.
- ROMERO, A.G.F. **Avaliação agronômica de formulações de isoflavonóide estimulante da micorrização no milho (*Zea mays* L.)**. 40 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- ROSEWARNE, G.M.; BARKER, S.J.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A.; SCHACHTMAN, D.P. A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, Oxford, v.144, p.507-516, 1999.
- RUBINFELD, A.; KEREN-LEHRER, T.; HADAS, G.; SMILANSKY, Z. Hierarchical analysis of large-scale two-dimensional gel electrophoresis experiments. **Proteomics**, Weinheim, v.3, p.1930-1935, 2003.
- RUIZ-LOZANO, J.M.; COLLADOS, C.; BAREA, J.M.; AZCON, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, Oxford, v.151, p.493-502, 2001.

- SALZER, P.; HAGER, A. Effects of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bond proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) cells. **Trees**, Berlin, v.8, p.49–55, 1993.
- SALZER, P.; CORBIÈRE, H.; BOLLER, T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. **Planta**, New York, v.208, p.319–325, 1999.
- SALZER, P.; HÜBNER, B.; SIRRENBORG, A.; HAGER, A. Differential effect of purified spruce chitinases and β -1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, p.957-968, 1997.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** III. s.l. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. paginação irregular.
- SAMRA, A.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Detection of symbiosis-related polypeptides during the early stages of the establishment of arbuscular mycorrhiza between *Glomus mosseae* and *Pisum sativum* roots. **New Phytologist**, Oxford, v.135, p.711-722, 1997.
- SAMRA, A.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Changes in polypeptide profiles of two pea genotypes inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. In: AZCON-AGUILAR, C. BAREA, J.M. (Ed.). **Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development**. Brussels: European Community, 1997. p.263-266.
- SARAVAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of samples extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, v.4, p.2522-2532, 2004.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, Oxford, v.149, p167-192, 2001.
- SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v.24, p.250-258, 2002.
- SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v.105, p.1413-1421, 2001.
- SHEVCHENKO, A.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; ENS, W.; STANDING, K.G. MALDI Quadrupole time-of-fly mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. **Analytical Chemistry**, Washington, v.72, p.2132-2141, 2000.
- SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K.G. Charging the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-ToF mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, Washington, v.73, p.1917-1926, 2001.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.16, p.257-283.

SIMONEAU, P.; LOUISY-LOUIS, N.; PLENCHETTE, C.; GEORGES STRULLU, D. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Applied Environmental Microbiology**, Oxford, v.60, p.1810-1813, 1994.

SIQUEIRA, J.O. **Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube growth and root colonization by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. Gainesville, 1983. 124p. Thesis (Ph. D.) - University of Florida.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/Lavras: ESAL/ FAEPE, 1988. 236p.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.12, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J.O.; POUYÚ, E.; MOREIRA, F.M.S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solos com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.23, n.5, p.569-580, 1999.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜRMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biотecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v.25, p.12-21, 2002.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. London, Academic Press: 1997. p.293.

SNYDER, A.P. Interpretation of peptide and protein mass spectra. In: _____. **Interpreting protein mass spectra: a comprehensive resource**. New York: Oxford University Press, 2000, 205p.

SOUZA, S.L. **Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. 2002. 71p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SPANU, P.; BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizae *Allium porrum*. **New Phytologist**, Oxford, v.109, p.119-124, 1988.

SUBRAMANIAN, K.S.; CHAREST, C. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. **Mycorrhiza**, Berlin, v.9, p.69-75, 1999.

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, p.167-178, 2002.

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

TARVAINEN O, MARKKOLA AM, AHONEN-JONNARTH U, JUMPPONEN A, STRÖMMER R Changes in ectomycorrhizal colonization and root peroxidase activity in *Pinus sylvestris* nursery seedlings planted in forest humus. **Scandianian Journal of Forest Research**, Stockholm, v.19, p.400–408, 2004.

TAWARAYA, K.; HASHIMOTO, K.; WAGATSUMA, T. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Mycorrhiza**, Berlin, v.8, p.67-70, 1998.

TAWARAYA, K.; WATANABE, S.; YOSHIDA, E.; WAGATSUMA, T. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. **Mycorrhiza**, Berlin, v.6, p.57-59, 1996.

TIMONEN, S.; SEN, R. Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots pine- *Suillus bovinus* and *Paxillus involutus* mycorrhizospheres developed in natural forest humus. **New Phytologist**, Oxford, v.138, p.355–366, 1998.

VALOT, B.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Subcellular proteomic analysis of a *Medicago truncatula* root microsomal fraction. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, p.1721-1732, 2004.

VALOT, B.; DIEU, M.; RECORBET, G.; RAES, M.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Molecular Biology**, Heidelberg, v.59, p.565-580, 2005.

VALOT, B.; NEGRONI, L.; ZIVY, M.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.S145-S155, 2006.

van RHIJN, P.; FANG, Y.; GALILI, S.; SAHUL, O.; ATZMON, N.; WININGER, S.; ESHED, Y.; LUM, M.; LI, Y.; TO, V.; FUJISHIGE, N.; KAPULNIK, Y.; HIRSCH, A.M. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and Rhizobium-induced nodules may be conserved. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, Washington, v. 94, p.253-265, 1997.

van WIJK, K.J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.501–508, 2001.

VERMA, D.P.S.; HU, A.; ZHANG, M. Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 85, p.253-265, 1992.

VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; MORSE, A.; REIST, R.; KOLDITZ-JAWHAR, R.; WARD, E.; UKNES, S.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Salicylic acids is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p.959-965, 1994.

VIERHEILIG, H.; BAGO, B.; ALBRECHT, C.; POULIN, M.P.; PICHÉ, Y. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. In: MANTHEY, J.A.; BUSLIG, B.S. (Ed.). **Flavonoids in the living system**. New York, Plenum Press: 1998. p.9-33.

VIERHEILIG, H. Regulatory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.82, p.1166-1176, 2004.

WAGNER, K.; RACAITYTE, K.; UNGER, K.K.; MILIOTIS, T.; EDHOLM, L.E.; BISCHOFF, R.; MARCO-VARGA, G. Protein mapping by two-dimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.893, p.293-305, 2000.

WERNER, D.; BAREA, J.M.; BREWIN, N.J.; COOPER, J.E. **Symbiosis**, Rehovot, v.32, p.83-104, 2002.

WILKINSON J.M. Fragmentation of polypeptides by enzymatic methods. In: _____. **Practical protein chemistry: a handbook**. New York: John Wiley and Sons, 1989.

WOOLHOUSE, H. W. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Ed.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.209-239.

WYSS, P.; MELLOR, R.B.; WIEMKEN, A. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins) immunologically cross-reactive with nodulins. **Planta**, New York, v.182, p.22-26, 1990.

YAN, J.X.; SANCHEZ, J.C.; BINZ, P.A.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D. Method for identification and quantitative analysis of protein lysine methylation using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and amino acids analysis. **Electrophoresis**, New York, v.20, p.749-754, 1999.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice roots. **Proteomics**, Weinheim, v.1, p.235-244, 2005.

YU, Q.; TAGL, C.; J. KUO. A critical review on methods to measure apoplastic pH in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.219, p.29-40, 2000.