**ANÁLISE DO PROTEOMA DO FLUIDO
INTERCELULAR DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
COLONIZADAS POR *Glomus clarum***

SIMÃO LINDOSO DE SOUZA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 2002

**ANÁLISE DO PROTEOMA DO FLUIDO
INTERCELULAR DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
COLONIZADAS POR *Glomus clarum***

SIMÃO LINDOSO DE SOUZA
Licenciado em Ciências Agrícolas

Orientador: Prof. Dr. **Marcio Rodrigues Lambais**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 2002

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

Souza, Simão Lindoso de

Análise de proteoma do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* / Simão Lindoso de Souza. - - Piracicaba, 2002.
71 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Biologia do solo 2. Cana-de-açúcar 3. Eletroforese 4. Fósforo 5. Fungos micorrízicos 6. Química do solo I. Título

CDD 633.61

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

Ofereço este trabalho como
Parte de minha gratidão a Deus.

Dedico a meu pai Eduwirger Estevão de Souza (in memorian), minha mãe Maria Leonice Lindoso de Souza, meus irmãos e seus cônjuges: Iêda, Salomão & Eliza, Ione & George, e Patrícia. À minha sobrinha Sofia e ao anjo Gabriel.

“Reserve tempo para ler, é esta a base da sabedoria...
Reserve tempo para trabalhar, é este o preço do êxito...
Reserve tempo para se divertir, é este o segredo da juventude...”

Trecho de uma antiga exortação inglesa

“Educar não é apenas acender um cântaro, mas manter a chama”

AGRADECIMENTOS

Grato a Deus, por conceder-nos a vida, como forma de expressão de Sua sabedoria, e a inteligência para tentar entendê-la.

A Deus por me conceder uma família, base de tudo que posso vir a ser, por compreender com tanto carinho a minha ausência por tantos anos. A meu pai que, mesmo partindo tão cedo, deixou os mais nobres ensinamentos; à minha mãe que, com o carinho de mãe e de pai, soube educar e ensinar a retidão das coisas da vida; aos meus irmãos: Iêda, Salomão, Ione e Patrícia, por compartilharmos tudo o que somos e temos, e por entenderem minha ausência em tantos momentos, incentivando-me sempre.

A Marcio Lambais pela orientação, pelo apoio, pela oportunidade de trabalho e o constante otimismo com os resultados da pesquisa.

A Francisco Adriano (Fran) por despertar-me para o estudo em micorrizas, pela orientação na Iniciação Científica e por todas conversas.

Aos colegas de laboratório, por vivenciarmos juntos tantos momentos de trabalho e descontração: Adrianinha, Adriana, Beth, Bia, Daniele, Denise & Eduardo, Giuliana, Iara, Juliano, Leandra, Marco Antônio, Paulo, Pereira, Taís e todos estagiários. Em especial à Bia pela paciência, cooperação e seus preciosos bizús ao ensinar a técnica de 2D e todas análises de proteína.

Aos professores que contribuíram para minha formação.

Aos companheiros de curso: Ana Cristina, Cristiani, Tiago, Laércio, Jorge, Paulo, Gilmar, Marcelo, Aline, Camila.

Aos funcionários do Departamento de Solos: Márcia, Célia, Flávia, Andreza, Martinha, Chiquinho, Edu, Moisés, Nancy, Nelson, Sérgio, Udson e Zé, que sabem deixar o ambiente mais harmonioso. Em especial aos técnicos Luis Fernando Baldesin e Denise L. C. Mescolotti por serem sempre solícitos.

À moçada das peladas de sábado, pelos momentos de descontração: Neco, Sr. Ico, Ademir, Mussum, Alfredo, entre outros.

Aos amigos: Ana Dantas, Mariângela Guajará, Terezinha, Mauro, Salomão, Edinaldo (John Brega), Zé Wilson, Cidinha, Márcio Piratello e Dirceu Macagnan. A Geovane, Nildo, Miguel, Sandrinha, Edsão & Lázara, Luizão & Cleide pela amizade e tantos momentos de descontração nos fins de semana.

Aos companheiros e ex-companheiros de república: Geovane, Horácio, Élcio, Juliano, Dênis, Cristiano, Mauro e Manuel.

Às minhas "tutoras piracicabanas" D. Maria e D. Helena que não exitaram em ajudar sempre que necessário.

Aos colegas e amigos da *Embrapa* Agrobiologia. Em especial à Edilene, Marinete, Angélica, Itamar, Suzel, Liamara, Fran e Dra. Eliana.

Aos meus pais cariocas: Sr. Amilton e D. Ângela por me adotarem e me apoiarem sempre. O meu muito obrigado!

À Cristiane pelo apoio e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa no início deste trabalho.

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

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho, muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cana-de-açúcar	3
2.2 Micorrizas Arbusculares.....	5
2.3 Análise de proteomas para o entendimento de interações planta-microrganismos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Instalação do experimento	15
3.2 Determinação da massa da matéria seca da parte aérea	16
3.3 Quantificação da colonização intrarradicar.....	16
3.4 Extração do fluido intercelular das raízes.....	16
3.5 Quantificação de proteínas do FI.....	17
3.6 Análise de proteínas do FI por eletroforese em condições desnaturantes ..	17
3.7 Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida.....	18
3.7.1 Focalização isoeletrica (1ª dimensão).....	18
3.7.2 SDS-PAGE (2ª dimensão)	19
3.7.3 Aquisição das imagem.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Massa da matéria seca e acúmulo de nutrientes na parte aérea.....	21

4.2 Colonização intrarradicular	26
4.3 Separação de proteínas por eletroforese em condições desnaturantes	28
4.4 Análise do proteoma do FI de raízes por eletroforese bidimensional	30
4.4.1 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com <i>G. clarum</i> , cultivadas em condições de baixo P	30
4.4.2 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com <i>G. clarum</i> , cultivadas em condições de alto P	36
4.4.3 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas, cultivadas em condições de baixo P ou alto P	45
4.4.4 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com <i>G. clarum</i> , cultivadas em condições de baixo P ou alto P	49
5 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ANÁLISE DO PROTEOMA DO FLUIDO INTERCELULAR DE RÁIZES DE CANA-DE-AÇÚCAR COLONIZADAS POR *Glomus clarum*

Autor: SIMÃO LINDOSO DE SOUZA
Orientador: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

RESUMO

Os mecanismos que regulam o desenvolvimento de micorrizas arbusculares (MAs) em condições de baixo e alto nível de P ainda são desconhecidos. Tem sido proposto que proteínas secretadas no apoplasto das raízes podem ter papel importante na regulação de MAs. A análise comparativa do proteoma do fluido intercelular (FI) de raízes colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) com o de raízes não-colonizadas, em condições de baixo e alto nível de P, poderia contribuir para a elucidação dos mecanismos que controlam o desenvolvimento das MAs, e foi o objetivo deste trabalho. Plântulas de cana-de-açúcar foram inoculadas com *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* ou *Gigaspora rosea* e cultivadas em substrato esterilizado contendo 20 ou 200 mg P kg⁻¹. Oito semanas após a inoculação, as plantas foram colhidas, e os seguintes parâmetros avaliados: matéria seca da parte aérea, acúmulo de nutrientes na parte aérea e colonização micorrízica intrarradicular. Os resultados mostraram que, em condições de alto P, a taxa de colonização intrarradicular por *G. clarum* e *G. etunicatum* foi menor do que no controle com

baixo P. Para a análise comparativa do proteoma do FI das raízes, quantidades iguais de proteínas de plantas não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P ou alto P, foram separadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida desnaturante. A análise dos proteomas do FI das raízes revelou a predominância de proteínas ácidas. Nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar, em condições de baixo P, foram detectadas 49 proteínas. Destas, 8,2% apresentaram acúmulo induzido e 10,2% acúmulo suprimido ($\geq 50\%$) no FI de raízes colonizadas por *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado. Desse total, 13 proteínas foram detectadas somente no FI de raízes de plantas inoculadas e representam micorrizas putativas ou proteínas fúngicas extracelulares, induzidas em condições de baixo P. Nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar, em condições de alto P, foram detectadas 56 proteínas. Destas, 8,9% apresentaram acúmulo induzido e 16,1% acúmulo suprimido ($\geq 50\%$) no FI de raízes colonizadas por *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado. Desse total, 12 proteínas foram detectadas somente no FI de raízes de plantas inoculadas e representam micorrizas putativas ou proteínas fúngicas extracelulares, induzidas em condições de alto P. Comparando-se os proteomas do FI de raízes de plantas não-inoculadas, em condições de baixo e alto P, foram detectadas 16 proteínas únicas de condições de baixo P e 24 proteínas únicas de condições de alto P. Comparando-se os proteomas do FI de raízes de plantas inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo e alto P, foram detectadas 12 proteínas únicas de condições de baixo P e 5 proteínas únicas de condições de alto P. Essas proteínas podem ter papéis importantes, diretos ou indiretos, no controle de MAs. A caracterização das proteínas com acúmulo diferencial no FI de raízes de cana-de-açúcar por espectrometria de massa e/ou seqüenciamento N-terminal poderá contribuir para definir suas possíveis funções nas MAs.

ANALYSIS OF THE INTERCELLULAR FLUID PROTEOME OF SUGARCANE ROOTS INOCULATED WITH *Glomus clarum*

Author: SIMÃO LINDOSO DE SOUZA

Adviser: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

SUMMARY

The mechanisms controlling arbuscular mycorrhizae (AM) development at different soil P concentrations are not understood. It has been proposed that proteins secreted in the root apoplast may have important roles in AM regulation. The analyses of the intercellular fluid (IF) proteome from sugarcane roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi, grown at low or high P conditions, compared to the IF proteome from not-inoculated roots may contribute to the understanding of the mechanisms controlling AM development, and was the aim of this work. Sugarcane seedlings were inoculated with *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* or *Gigaspora rosea*, and grown in sterilized substrate containing 20 or 200 mg P kg⁻¹. Eight weeks after inoculation, the plants were harvested and the following parameters evaluated: shoot dry weight, nutrients in the shoots and intraradical fungal growth. The results showed that intraradical colonization by *G. clarum* and *G. etunicatum* at high P conditions was significantly lower than at low P. Equal amounts of proteins were

used to compare the proteome from the IF of not-inoculated and *G. clarum* inoculated roots, at low and high P conditions, using 2D-PAGE. The proteome analyses revealed the predominance of acidic proteins in the IF of sugarcane. A total of 49 proteins were detected in the IF of sugarcane at low P soil concentration. From those, 8.2% were induced and 10.2% suppressed ($\geq 50\%$) in the IF of roots inoculated with *G. clarum*, as compared to not-inoculated controls. Thirteen proteins were detected only in the IF of mycorrhizal roots, and represent putative mycorrhizins or extracellular fungal proteins induced at low P conditions. A total of 56 proteins were detected in the IF of sugarcane at high P conditions. From those, 8.9% were induced and 16.1% suppressed ($\geq 50\%$) in the IF of roots inoculated with *G. clarum*, as compared to not-inoculated controls. Twelve proteins were detected only in the IF of mycorrhizal roots, and represent putative mycorrhizins or extracellular fungal proteins, induced at high P conditions. Comparing the proteomes from the IF of non-inoculated sugarcane roots at low and high P conditions, 16 proteins were detected only at low P conditions, whereas 24 proteins were detected only at high P conditions. Comparing the proteomes from the IF of sugarcane roots inoculated with *G. clarum* at low and high P conditions, 12 proteins were detected only at low P conditions, whereas 5 proteins were detected only at high P conditions. Those proteins may be, direct or indirectly, involved in the development and/or efficiency of AM. Further characterization of those proteins by mass spectrometry and/or N-terminal sequencing would contribute to the determinations of their possible functions in AM.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos pertencentes à ordem Glomales têm distribuição generalizada nos ecossistemas e formam associações mutualísticas com a maioria das plantas vasculares, conhecidas com micorrizas arbusculares (MAs) e caracterizadas pelo desenvolvimento de estruturas típicas chamadas arbúsculos.

O estabelecimento das MAs depende de uma série de eventos bioquímicos específicos, os quais têm início antes do contato físico entre os simbioses. Aparentemente a simbiose é regulada por fatores produzidos pelo hospedeiro e depende da interação dos genomas dos simbioses.

As MAs, na maioria dos casos, estimulam o crescimento vegetal, como uma consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral da planta, principalmente no aumento da absorção de P em solos com baixa concentração desse nutriente. Por sua vez, a disponibilidade de P exerce importante papel no controle da intensidade da colonização e do efeito da simbiose sobre a planta.

Os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento e manutenção das MAs ainda são desconhecidos. No entanto, é sabido que o P é um importante regulador da colonização intrarradicular e eficiência simbiótica. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o efeito do P no desenvolvimento e funcionamento de MAs. No entanto, nenhuma delas foi comprovada até o momento.

Proteínas secretadas no apoplasto de raízes podem ter papel importante na regulação do desenvolvimento e manutenção de simbioses. A análise comparativa do proteoma do fluido intercelular (FI) de raízes colonizadas

por fungos micorrízicos arbusculares com o de raízes não-colonizadas, em condições de baixo e alto níveis de P, poderia contribuir para a elucidação dos mecanismos que controlam o desenvolvimento das MAs.

Este trabalho objetivou a análise comparativa do proteoma do FI de raízes de cana-de-açúcar não-colonizadas e colonizadas por *Glomus clarum*, cultivadas em condições de baixo e alto níveis de P, utilizando eletroforese bidimensional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é umas das mais importantes plantas cultivadas na atualidade. Seu cultivo estende-se por áreas tropicais e subtropicais em mais de oitenta países. Em 1995, $1,2 \times 10^9$ Mg de cana-de-açúcar foram produzidas numa área estimada de 18×10^6 ha e usadas, principalmente, para a produção de açúcar ou etanol (FNP, 2001).

O Brasil destaca-se no cenário mundial como maior produtor de cana-de-açúcar, possuindo cerca de 5×10^6 ha cultivados com essa cultura, sendo seguido, em ordem decrescente de produção, por Índia, China, Paquistão e Tailândia. A produção brasileira na safra 1999/2000 foi de $3,24 \times 10^8$ Mg (FNP, 2001). Esse destaque internacional deve-se ao fato de o Brasil ser responsável por 25% da produção mundial, sendo que a metade desta produção é oriunda do Estado de São Paulo.

A introdução da cana-de-açúcar no Brasil teve início na metade do século XVI, através de Martim Afonso de Souza que a trouxe para a Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo. Sabe-se que de 1500 a 1600 a cana-de-açúcar estendeu-se por quase todos os países da América do Sul. No Brasil, com o início da colonização portuguesa, a cana-de-açúcar, caracterizou-se como uma das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (Lucchesi, 1995).

Devido a isso, a cultura da cana-de-açúcar possui uma grande importância sócio-econômica, sendo a maior geradora de empregos diretos e indiretos, inclusive de trabalhadores não qualificados, apresentando assim, impactos sociais bastante expressivos do ponto de vista quantitativo (Orplana, 2002), além de gerar produtos de valores econômicos e culturais consideráveis. Tal importância é atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada *in natura*, como forragem para alimentação animal ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool combustível e industrial (Costa, 2001). Seus subprodutos podem também ser utilizados. O bagaço é matéria prima para produção de energia e papel; a vinhaça pode ser utilizada como fertilizante ou complemento de ração para animais; a ponta da cana, que geralmente é descartada por ocasião da colheita, pode ser utilizada para alimentação animal ou extração de palmito para alimentação humana (Lucchesi, 1995).

A produção da cana-de-açúcar depende de solos férteis com pH ideal variando de 6,0 a 6,5. A elevada exigência da cana-de-açúcar por nutrientes, pode levar ao rápido esgotamento do solo, especialmente quando manejada em monocultivo (InfoAgro, 2002). O P é requerido em quantidades relativamente pequenas, quando comparado às quantidades de N e K (InfoAgro, 2002).

Nos solos das regiões tropicais e subtropicais, a maior parte do P encontra-se em formas pouco disponíveis às plantas, fator que, frequentemente, tem limitado as produções agrícolas, tornando a agricultura, nessas regiões, praticamente dependente de adições de fertilizantes fosfáticos (Silveira, 1992).

O P representa cerca de 0,25% da matéria seca da cana-de-açúcar (InfoAgro, 2002) e é essencial para a síntese de ácidos nucléicos, fosfolipídeos e ATP (Smith & Read, 1997), além de estar envolvido na regulação das várias vias metabólicas das plantas (Schachtman et al., 1998).

Poucos trabalhos têm sido realizados utilizando cana-de-açúcar em associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), devido ao fato de esta planta ter baixa dependência micotrófica (Siqueira & Franco, 1988) e ser uma gramínea de ciclo longo.

Devido à grande importância da cana-de-açúcar para a economia nacional, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) em parceria com a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (Copersucar), financiaram o projeto Genoma Cana-de-Açúcar (SUCEST), o qual visou caracterizar e analisar comparativamente ESTs (expressed sequence tags) de cana-de-açúcar. As informações geradas até o momento resultaram na identificação de vários genes de alto potencial biotecnológico. No entanto, genes envolvidos na regulação de MAs ainda não foram identificados. A análise de ESTs de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por FMAs poderia resultar na identificação de genes essenciais para o desenvolvimento e regulação de MAs.

2.2 Micorrizas Arbusculares

As MAs são associações simbióticas mutualísticas entre raízes de plantas vasculares e fungos da ordem Glomales (Harrison, 1998). Esta associação exerce enorme efeito sobre o comportamento das plantas (Siqueira & Franco, 1988; Silveira, 1992), aumentando seu crescimento e produção (Siqueira et al., 2002).

Os fungos pertencentes à ordem Glomales (Zigomicetos) (Morton & Benny, 1990) são conhecidos como micorrízicos arbusculares e agrupam-se em sete gêneros *Acaullospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Paraglomus* e *Scutellospora*, com aproximadamente 160 espécies descritas (INVAM, 2002). Estes fungos têm distribuição generalizada e formam

associações com a maioria das plantas vasculares, sendo a simbiose mutualística mais comum na natureza (Siqueira et al., 2002).

Evidências fósseis de fungos que se assemelham com o atual gênero *Glomus*, encontradas do período Ordoviciano (cerca de 460 milhões de anos) em associação com briófitas (Wilkinson, 2001) e em rochas do mesmo período (Redecker et al., 2000), sugerem que estes fungos precedem até mesmo a colonização terrestre por plantas vasculares e poderiam ter tido vida livre, ou talvez, formado associações micorrízicas com as briófitas, as quais foram as primeiras plantas terrestres. Esta segunda sugestão é mais plausível por dois motivos: (1) todos os atuais fungos pertencentes à ordem Glomales formam micorrizas; e (2) é sabido que os atuais fungos micorrízicos arbusculares formam associações com briófitas. Isto é de particular interesse no que se refere ao papel do mutualismo micorrízico para a colonização terrestre pelas plantas (Wilkinson, 2001).

Considerações sobre o processo evolutivo da biotrofia entre fungos e plantas, indicam que as MAs resultam de um alto grau de especialização nutricional de fungos saprofíticos, os quais evoluíram do necrotrofismo para o biotrofismo obrigatório. Como resultado desse processo, eles perderam sua capacidade patogênica e tornaram-se mutualistas. Portanto, as micorrizas parecem representar um parasitismo em seu mais alto grau de especialização (Siqueira & Franco, 1988).

O estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular depende de uma série de eventos para que ocorra a total e íntima interação entre os simbiossiontes. O processo de infecção ocorre a partir do contato de hifas infectivas, provenientes de esporos, hifas no solo ou hifas intrarradiculares, com as raízes das plantas. Em seguida, eventos morfológicos e bioquímicos específicos, regulados por ambos simbiossiontes e afetados por fatores abióticos, determinam o desenvolvimento da simbiose (Romero, 1999).

A troca de nutrientes entre os simbiossantes ocorre em estruturas fúngicas intrarradiculares especializadas, conhecidas como arbúsculos. Essas estruturas são formadas pela intensa ramificação dicotômica das hifas e invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (membrana periarbuscular) (Siqueira et al., 2002). Concomitantemente ao crescimento no interior das raízes, o fungo mantém um micélio externo que absorve fosfato do solo e depois o libera para a raiz.

A parede celular do arbúsculo e a membrana periarbuscular que a envolve são separadas por uma interface característica, importante para o controle de simbiose. Nela estão presentes vários tipos de moléculas, incluindo xiloglucanas, arabinogalactanas, β -D-1,4 glucanas, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, enzimas hidrolíticas e moléculas sinais (Siqueira et al., 2002).

As MAs, na maioria dos casos, estimulam o crescimento vegetal, como uma consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral da planta, principalmente no aumento da absorção de P (Siqueira et al., 2002). Nas situações em que a concentração e mobilidade do P no solo são baixas, a sua absorção é favorecida nas plantas associadas aos FMAs. Por sua vez, a disponibilidade de P exerce importante papel no controle da intensidade de colonização e do efeito da simbiose sobre a planta hospedeira (Siqueira & Franco, 1988).

A capacidade de algumas plantas formarem MAs é inversamente proporcional à disponibilidade de P no substrato, e esse pode ser considerado um dos principais fatores que afetam as MAs. No entanto, é conveniente salientar que interações do genótipo do fungo e da planta e destes com o ambiente são determinantes da eficiência simbiótica (Melloni et al., 2000).

O nível de P acima do qual não há resposta das plantas à colonização com FMAs precisa ser determinado experimentalmente, pois a inoculação com

FMA em solos com níveis de P superiores ao ótimo, pode resultar em depressão do crescimento vegetal (Siqueira & Franco, 1988).

Os mecanismos que regulam o desenvolvimento e funcionamento das MAs ainda são desconhecidos. Entretanto, tem sido sugerido que genes com expressão diferencial em MAs poderiam ter papel importante no controle da simbiose (Lambais, 1999). O conhecimento sobre a biologia molecular e regulação desta simbiose é correntemente limitado. Estudos sobre nutrição mineral em MAs têm se concentrado em fosfato (P). Normalmente a absorção de P é aumentada em plantas micorrizadas, e a concentração de P na parte aérea é, aparentemente, o fator que regula a simbiose (Harley & Smith, 1983; Smith & Gianinazzi-Perason, 1988).

Embora os mecanismos envolvidos na regulação da colonização intrarradicular e da eficiência simbiótica pelo P não sejam conhecidos, existem evidências mostrando que esta regulação depende do *status* nutricional da parte aérea (Koide & Li, 1990; Bolan, 1991). 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).

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 proteínas de defesa específicas, como quitinases, inibindo o crescimento fúngico intrarradicular (Lambais & Mehdy, 1995).

A pesquisa por genes que são induzidos durante interações biotróficas tem sido efetiva na identificação de relevantes componentes bioquímicos. Na interação ectomicorrízica *Pisolithus tinctorius-Eucalyptus*, proteínas abundantes na parede celular fúngica foram identificadas. Similarmente, proteínas da interface entre *Glomus versiforme* e *Medicago truncatula* têm sido caracterizadas (Hahn & Mendgen, 2001).

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

Genes codificando diferentes isoformas de quitinases apresentam expressão diferencial durante o desenvolvimento de MAs, mas seu papel na simbiose ainda não é conhecido. Normalmente, as atividades de quitinases são suprimidas nos estágios iniciais do desenvolvimento de MAs e induzidas posteriormente (Spanu et al., 1989; Lambais & Mehdy, 1993). Isoformas específicas de quitinases são induzidas em células contendo arbúsculos e/ou suas proximidades, em condições de altos níveis de P (Lambais & Mehdy, 1998). É possível que quitinases estejam envolvidas na degradação da parede celular fúngica, inibindo a colonização intrarradicular. Contudo, a expressão constitutiva de uma isoforma básica de quitinase em plantas de tabaco não inibiu o desenvolvimento de *Glomus intraradices* (David et al., 1998).

Acúmulo limitado de fitoalexinas pode ocorrer transientemente durante os estágios iniciais do desenvolvimento de MAs (Harrison & Dixon, 1993) ou durante os estágios mais tardios do processo de colonização

intrarradicular (Morandi et al., 1984; Wyss et al., 1991). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento da MA em alfafa colonizada por *Glomus intraradices*, foram observados aumentos transientes nas atividades enzimáticas de fenilalanina amônia-liase (FAL) e chalcona isomerase (CHI), e nos níveis de seus respectivos mRNAs nas regiões colonizadas da raiz, seguidos de posterior supressão (Volpin et al., 1994; Volpin et al., 1995). Em um outro estudo foi observado que, no início do desenvolvimento da micorriza, o nível de mRNAs codificando FAL e chalcona sintase (CHS) em raízes de alfafa colonizadas por *Glomus vesiforme* é induzido, enquanto que o nível de mRNAs codificando isoflavona redutase (específica para a síntese de fitoalexinas isoflavonóides) é suprimido, comparado com os níveis desses mRNAs em raízes não-micorrizadas (Harrison & Dixon, 1993). Foi observado também que a indução de CHS era localizada em células contendo arbúsculos (Harrison & Dixon, 1994). Já, em raízes de feijão micorrizadas, foi observado que, durante um período experimental de 8 semanas, os níveis de mRNAs codificando CHI são suprimidos em relação às raízes não -micorrizadas, em baixo e alto níveis de P, enquanto que os níveis de FAL e CHS são comparáveis (Lambais & Mehdy, 1993). Em raízes de soja colonizadas com diferentes isolados de FMAs, observou-se a ocorrência de uma indução inicial seguida de posterior supressão, quando as raízes eram colonizadas pelo isolado mais infectivo (Lambais & Mehdy, 1996). Quando as raízes eram colonizadas pelo isolado menos infectivo, os níveis de mRNAs para CHS eram comparáveis com os das raízes não micorrizadas. Esses dados sugerem a existência de mecanismos ativos para a supressão de genes vegetais relacionados ao sistema de defesa, e não somente uma falta ou baixo nível de elicitação.

Usando eletroforese bidimensional e microssequenciamento de proteínas, pelo menos 16 proteínas da membrana plasmática que são

diferencialmente expressas foram detectadas em raízes de tomate infectadas e não-infectadas por FMAs (Hahn & Mendgen, 2001).

Como ocorre em várias interações planta-microrganismo, sinais moleculares poderiam ser reconhecidos na membrana plasmática e transmitidos através de mensageiros secundários até sítios de transcrição gênica, regulando o processo de síntese e/ou a estabilidade de transcritos (mRNAs) interação específicos e/ou interação modulados. Em MAs, essa regulação diferencial de genes vegetais e fúngicos específicos, ainda não identificados, seria responsável pelo controle do desenvolvimento e funcionamento da simbiose. O estudo dos processos de sinalização e transdução de sinais em MAs são bastante complexos, pois as diferentes etapas dos processos de infecção, colonização e troca de nutrientes, são provavelmente, reguladas por uma troca permanente de sinais entre os simbiotes.

Tem sido observada a expressão diferencial de vários genes/proteínas em raízes colonizadas por FMAs. Em *Medicago truncatula*, foi observada a indução da expressão de quatro genes em condições de deficiência de P, incluindo dois genes de transportadores de P, um gene de função desconhecida (Mt4) e um gene homólogo a uma fosfatase ácida. Esses genes foram suprimidos após a colonização da raiz por fungos micorrízicos arbusculares (Harrison, 1999).

A utilização de modelos de sinalização que ocorrem nas simbioses leguminosas/*(Brady)Rhizobium* e interações planta/patógeno para a compreensão dos processos atuantes em MAs são de grande valia. No entanto, vários aspectos relacionados à especificidade das interações devem ser considerados. A existência de fatores comuns entre simbioses leguminosas/*(Brady)Rhizobium* e MAs tem sido sugerida, com base no fato de que mutantes de plantas de ervilha que não são capazes de desenvolver MAs típicas, e têm a infecção bloqueada num estágio imediatamente posterior à

formação do apressório, são também não-nodulantes (Duc et al., 1989; Gianinazi-Pearson et al., 1995).

Diante desta comparação, sabe-se que altos níveis de nitrato inibem o estabelecimento da interação entre leguminosas e rizóbios, assim como altos teores de P são inibitórios para o desenvolvimento de MAs (Harley & Smith, 1983). Wyss et al. (1990a) utilizaram dois tipos de mutantes de soja em um estudo onde procuraram verificar a existência de um fator comum para esse mecanismo de controle. O primeiro tipo de mutante é formado por plantas não-nodulantes e o segundo, por plantas super-nodulantes, insensíveis a altos níveis de nitrato. Acredita-se que a inibição da nodulação em altos níveis de nitrato é mediada por um fator presente na parte aérea das plantas, fator este que estaria também ausente nas plantas super-nodulantes. Os autores procuraram verificar se os mutantes super-nodulantes também seriam capazes de formar MAs em altos níveis de P. Observaram que a micorrização nas plantas de soja super-nodulantes foi inibida por altos teores de P, indicando que o fator que controla a supressão da micorrização em altos níveis de P não é o mesmo fator que controla a nodulação em altos níveis de nitrato.

Adicionalmente, Wyss et al. (1990b) detectaram, em raízes micorrizadas, proteínas semelhantes às nodulinas (específicas de nódulos), através de anticorpos obtidos especificamente contra nodulinas. Fröhling et al. (1997) identificaram transcritos de uma das mais importantes nodulinas, a leghemoglobina VfLb 29, em raízes de *Vicia faba* colonizadas por *Glomus fasciculatum*, embora o papel desta proteína em interações micorrízicas não seja esclarecido. Uma das possibilidades seria o envolvimento da leghemoglobina no fornecimento de oxigênio ao FMA, da mesma forma que em interações leguminosas-rizóbio. Sugere-se ainda, que os processos envolvidos na nodulação de plantas tenham evoluído a partir de mecanismos básicos já

estabelecidos para a interação micorrízica (Frühling et al., 1997). Outros genes codificando nodulinas também apresentam expressão diferencial em MAs.

Em raízes de *Medicago sativa* colonizado por *Glomus intraradices* foi observado acúmulo de transcritos de dois genes que se expressam no início do desenvolvimento nodular (Rhijn et al., 1997). Albrecht et al. (1998) mostraram que, em ervilhas, genes de nodulinas precoces PsENOD5 e PsENOD12A são induzidos durante a interação com *Rhizobium* e também com *Gigaspora margarita*, e que o locus Sym8 é essencial para a indução destes genes em ambas as associações endossimbióticas. Além disso, genes similares àqueles que codificam nodulinas tardias são expressos em raízes de leguminosas colonizadas por FMA. O gene PsNlec1, o qual codifica uma glicoproteína semelhante à lecitina, e que se expressa intensamente em nódulos de ervilha, também apresenta a expressão induzida em raízes de ervilha colonizadas por *Glomus versiforme* (Balestrini et al., 1999).

Lambais (1999) observou que a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja tratados com o fluido intercelular de raízes de citros colonizadas por *Glomus intraradices*, em condições de baixo e alto P, era inferior aos tratados com fluido intercelular de raízes não-micorrizadas, independentemente do nível de P. Esses dados sugerem a existência de uma molécula supressora da síntese de fitoalexinas ativa no fluido intercelular de raízes micorrizadas. Outras moléculas importantes para o controle do desenvolvimento de MAs poderiam, igualmente, se acumular no fluido intercelular. A identificação dessas moléculas seria de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos que regulam o desenvolvimento e eficiência de MAs.

2.3 Análise de proteomas para o entendimento de interações planta-microrganismos

A análise de proteínas com expressão diferencial no fluido intercelular de raízes colonizadas por FMAs é uma abordagem alternativa para o estudo dos mecanismos de regulação de MAs. O principal problema em análises de proteínas é a produção de modelos estáveis e reproduzíveis, que possam ser obtidos por uma padronização das condições de cultivo e procedimentos de extração. Estes procedimentos experimentais geram maiores dificuldades por serem os FMAs simbiontes obrigatórios (Avio & Giovannetti, 1998).

A técnica da eletroforese bidimensional resulta da combinação da focalização isoelétrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (O' Farrell, 1975). Durante algum tempo, o uso dessa técnica foi limitado, devido à sua baixa resolução e reprodutibilidade. No entanto, com o desenvolvimento de novas matrizes e técnicas analíticas, a eletroforese bidimensional foi sensivelmente aprimorada.

A eletroforese bidimensional tem sido utilizada para estabelecer mapas padrões de células, tecidos e modelos de desenvolvimento (Wijk, 2001). Muitas proteínas detectadas nesses mapas, podem ter sua suposta identidade definida por sequenciamento do N-terminal e espectrometria de massa (MALDI-ToF), em combinação com ferramentas de bioinformática (Natera, et al., 2000). A técnica também permite a comparação dos produtos protéicos produzidos por grupos celulares exposto a diferentes condições biológicas.

A análise comparativa dos mapas gerados permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas, sob diferentes condições (Guerreiro et al., 1997). A análise diferencial de proteomas tem sido utilizada em estudo de interações simbióticas entre rizóbio e leguminosas (Guerreiro et al., 1997; Natera et al., 2000) e ectomicorrizas (Guttenberger & Hampp, 1992), mas ainda não foi utilizada no estudo de MAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalação do experimento

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) var. SP 80-3280 obtidas na COPERSUCAR 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 uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v:v), previamente esterilizada.

Após o período de aclimação, as mudas foram transplantadas para vasos contendo 1 kg da mesma mistura utilizada como substrato nas bandejas de isopor, adubada com solução contendo: 240 mg de N (em três aplicações com intervalo de 20 dias), 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 P foi aplicado em duas concentrações: 20 ou 200 mg de P kg⁻¹ de substrato. Ainda por ocasião do transplante, as mudas foram inoculadas com *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* ou *Gigaspora rosea*. O inóculo era constituído de solo contendo esporos, hifas e fragmentos de raízes de *Brachiaria decumbens* colonizadas pelos fungos micorrízicos. Como controle, utilizou-se solo contendo raízes de *B. decumbens* não colonizadas por FMAs.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado num esquema fatorial 2x4, sendo dois níveis de P (alto e baixo), quatro espécies de FMAs (*G. clarum*, *G. etunicatum*, *Gi. rosea* e controle não-inoculado), com dez repetições, totalizando 80 parcelas.

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ/USP, por oito semanas. Após este período, as plantas foram colhidas.

3.2 Determinação da massa da matéria seca da parte aérea

Para determinação da massa da matéria seca, a parte aérea foi separada e seca a 65 °C até atingir massa constante.

As plantas foram enviadas para o Laboratório de Análises de Solos e de Plantas da ESALQ-USP para a determinação da concentração de nutrientes totais na parte aérea, segundo a metodologia de Malavolta et al. (1997).

3.3 Quantificação da colonização intrarradicular

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

3.4 Extração do fluido intercelular das raízes

A extração do FI das raízes 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 Parafilm®. Segmentos de raízes de aproximadamente 2,5 cm foram cortados e lavados com ddH₂O para remover detritos da superfície e/ou contaminação citoplasmática, e acondicionados em seringas plásticas de 25 mL. Às seringas foi adicionada ddH₂O contendo PMSF 1 mM e EDTA 1 mM, até um volume final de 20 mL. As raízes foram infiltradas à vácuo por 2 minutos a 4 °C. O excesso de água foi eliminado por gravidade e as raízes foram centrifugadas a 800x *g* por 15 min a 4°C. O FI foi recolhido, filtrado com de filtro de 0,2 µm de porosidade (Millipore®), para remoção de microrganismos e armazenado a -80°C.

3.5 Quantificação de proteínas do FI

A quantificação de proteínas do FI foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em microplacas, utilizando-se o kit para quantificação de proteínas da BioRad.

Para a determinação das concentrações de proteínas foram misturadas 160 µL de FI de cada tratamento e 40 µL do reagente de Bradford concentrado (BioRad). Estas misturas foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente, e as absorbâncias a 595 nm determinadas em espectrofotômetro de microplacas (Microplate Reader, BioRad). As concentrações das proteínas foram calculadas utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.6 Análise de proteínas do FI por eletroforese em condições desnaturantes

O equivalente a 2 µg de proteínas de cada tratamento foi precipitado com 3 volumes de acetona pura durante 12 h a -20°C. As proteínas precipitadas foram centrifugadas a 8000x *g* por 30 min a 4°C. A solução de acetona foi descartada e as proteínas foram solubilizadas em 10 µL de tampão de carregamento (Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 20%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,005% e DTT 10 mM). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 min, e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida descontínuo (gel empilhador 5% acrilamida/bis-acrilamida e gel separador 12,5% acrilamida/bis-acrilamida) em tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%). A separação eletroforética foi feita em duas etapas: a primeira usando 90V fixos durante 30 min e a segunda usando 30 mA por gel durante aproximadamente 3 horas, a 10 °C. Após a eletroforese, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com prata, conforme Blum et al. (1987), modificado. Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora (etanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,075%), por 3 h; etanol 50% 3x 20 min; solução de sensibilização (tiosulfato de sódio 0,02%), por 1 min; ddH₂O, 3x 20 s; solução de impregnação (nitrato de prata 0,2%, formaldeído 0,075%), por 20 min; ddH₂O, 3x 20 s; solução de revelação (carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,0008%, formaldeído 0,05%) até o aparecimento das bandas; solução bloqueadora (ácido acético 5%), por 10 min.

3.7 Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida

3.7.1 Focalização isoeétrica (1ª dimensão)

O equivalente a 150 µg de proteínas foi precipitado com três volumes de acetona pura durante 12 h a -20°C. Após recuperação por centrifugação

(8000x *g* por 30 min a 4°C), as proteínas foram solubilizados em solução Tris-HCl 50mM (pH 8,8), DTT 100mM, SDS 0,5%. Esta solução foi aquecida a 95°C por 5 minutos e adicionada à solução contendo uréia 8M, CHAPS 4%, DTT 70 mM, anfolinas 0,8% (IPG buffer, pH 3-10 não-linear; Amersham Pharmacia Biotech) e azul de bromofenol 0,005%. Esta solução foi agitada por 1 min, seguido de 1 hora de descanso, e depois novamente agitada por mais 1 min. Sobre as fitas (IPG 18 cm, gradiente de pH 3-10 não linear; Amersham Pharmacia Biotech) foram acrescentados 1,5 mL de óleo mineral (Fluid Cover, Amersham Pharmacia Biotech) para evitar evaporação dos reagentes durante a reidratação. A focalização foi feita utilizando gradiente de pH imobilizado. As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica (IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech) durante 12 horas a 20°C. A focalização isoeletrica foi feita 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. Depois da focalização, as fitas foram lavadas com ddH₂O e armazenadas a -80°C.

3.7.2 SDS-PAGE (2ª dimensão)

Depois da focalização isoeletrica, as fitas IPG foram lavadas com ddH₂O, 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% e DTT 2%. A segunda solução era composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6M, glicerol 30% (v:v), SDS 2%, iodoacetamida 2,5% (Görg et al., 1987) e azul de bromofenol 0,005%. As fitas IPG foram equilibradas por 12 minutos em cada solução.

A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida (180x160x1,5 mm), conforme descrito por Laemmli

(1970), modificado. O gel foi preparado com acrilamida 12,5% Bis-acrilamida (37,5:1 - m:m), Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05%, e TEMED 0,05%. Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e cobertas com uma solução de agarose 0,5% em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%). A separação eletroforética das proteínas foi feita a 10°C, em cuba SE 600 (Amersham Pharmacia Biotech). Na primeira etapa, utilizou-se 90V fixos durante 30 minutos. Na segunda etapa, utilizou-se 30mA por gel durante aproximadamente 3-4 horas. Em seguida, os géis foram lavados em ddH₂O por 5 minutos, e as proteínas coloridas com prata, conforme descrito no item 3.6.

3.7.3 Aquisição das imagens

As imagens das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar detectadas por eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida foram obtidas por varredura, utilizando-se um densitômetro a laser ("Personal Densitometer SI", Molecular Dynamics). As análises dos géis foram feitas com o programa Image Master 2D versão 3.10 (Amersham Pharmacia Biotech). 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 proteoma total de *Xylella fastidiosa*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Massa da matéria seca e acúmulo de nutrientes na parte aérea

Independentemente da concentração de P no substrato, não foram observadas diferenças significativas entre a massa de matéria seca da parte aérea das plantas não-inoculadas e a massa de plantas inoculadas com *G. clarum*, *G. etunicatum* ou *G. rosea*, indicando que a presença dos fungos não afetou a produção de biomassa aérea das plantas (Figura 1). No entanto, plantas não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P no substrato, produziram, em média, 20,8% menos biomassa, quando comparadas a plantas cultivadas em condições de baixo P. Esse comportamento é atípico quando se trata de um nutriente de baixa mobilidade no solo, como é o caso do P, e poderia ser explicado pela maior alocação de recursos para produção da biomassa radicular, em condições de alto P, para a absorção de outros nutrientes. Alternativamente, é possível que o P em alta concentração no substrato tenha formado complexos cálcicos, diminuindo a disponibilidade de P e Ca. As concentrações de Ca foram extremamente baixas, se comparadas com a quantidade de Ca adicionada no substrato de cultivo.

As Figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, o acúmulo de macro e micronutrientes totais na parte aérea de plantas não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*. O acúmulo de N, K e Mg (Figura 2) e Cu, Fe Mn e Zn (Figura 3) não diferiram significativamente entre os tratamentos, mostrando que tanto o fator inoculação como o fator nível de P não afetaram a absorção destes

Figura 1 - Massa da matéria seca da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cultivadas por oito semanas em condições de baixo e alto P (20 e 200 mg kg⁻¹, respectivamente), inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos com baixo e alto P dentro de cada tratamento de inoculação. Letras minúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos de inoculação dentro do mesmo nível de P. Os dados são médias de dez repetições.

Figura 2 - Acúmulo de macronutrientes na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) cultivadas em condições de baixo (BP) ou alto (AP) nível de P no substrato. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$) para cada elemento analisado. Letras maiúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos baixo e alto nível de P. Letras minúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos de inoculação. Os dados são médias de cinco repetições.

Figura 3 - Acúmulo de micronutrientes na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar não inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) cultivadas em condições de baixo (BP) ou alto (AP) nível de P no substrato. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$) para cada elemento analisado. Letras maiúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos baixo e alto nível de P. Letras minúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos de inoculação. Os dados são médias de cinco repetições.

nutrientes pelas plantas.

Já a concentração de Ca e S na parte aérea das plantas diminuiu significativamente nos tratamentos com alto P no substrato, independente do fator inoculação (Figura 2). O Ca pode se complexar com fosfatos contidos no solo, e como a quantidade de P requerido pelas plantas é maior que a de Ca, este último pode ser quase que totalmente complexado em condições de alto P no substrato, comprometendo sua absorção pelas plantas. A presença de altas concentrações de P no substrato, pode inibir a absorção do S pelas plantas e, por consequência, diminuir seu acúmulo na parte aérea das plantas (Malavolta et al., 1997).

A absorção do B diminuiu com o aumento da concentração de P no substrato, independente do fator inoculação (Figura 3). O comportamento do B no solo é muito variável, por ser absorvido na forma molecular. No entanto, sua absorção é maior em condições nutritivas balanceadas. O aumento do P no substrato pode ter desbalanceado os nutrientes, resultando em uma menor absorção de B.

As plantas cultivadas em condições de baixo nível de P, tanto não-inoculadas como inoculadas, acumularam menores teores de P quando comparadas com as plantas cultivadas em condições de alto nível de P (Figura 2). Esse resultado é coerente em plantas não-inoculadas e pode ser aceito para plantas colonizadas por FMAs cultivadas em casa-de-vegetação, já que a eficiência de absorção de P para plantas micorrizadas é variável (Siqueira & Franco, 1988). Mesmo havendo a colonização intrarradicular nas plantas cultivadas com baixo nível de P, não houve aumento significativo no acúmulo de P na parte aérea das plantas.

No geral, os dados indicam que as plantas não-inoculadas e inoculadas com *G. clarum* apresentaram a mesma concentração de nutrientes na parte aérea, de modo que os efeitos sobre o proteoma do FI poderão ser

atribuídos ao fator inoculação e não a variações no estado nutricional das plantas.

4.2 Colonização intrarradicular

As médias das taxas de colonização intrarradicular das plantas inoculadas com *G. clarum*, *G. etunicatum* ou *Gigaspora rosea*, cultivadas em condições de baixo P ou alto P, são apresentadas na Figura 4. As plantas não-inoculadas não apresentaram colonização. Os níveis de colonização diferiram estatisticamente entre si apenas nas plantas inoculadas com *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*, sendo maiores em condições de baixo P, quando comparados com alto P. Esse comportamento é esperado, uma vez que condições de alto P no substrato inibem o crescimento fúngico intrarradicular (Silveira, 1992)

Com o aumento do P, a colonização diminuiu em 50% nas plantas inoculadas com *G. clarum* e, em 14% nas plantas inoculadas com *G. etunicatum*. Apesar da colonização intrarradicular de plantas inoculadas com *Gigaspora rosea* ter sido reduzida em 15% com o aumento de P no substrato, não houve diferença significativa entre plantas cultivadas em condições de baixo e alto P.

Para a análise comparativa do proteoma do FI, que tem como fator limitante o pequeno número de tratamentos que podem ser processados e comparados, utilizou-se apenas as plantas inoculadas com *G. clarum*, cultivadas nos dois níveis de P, devido à maior diferença entre as taxas de colonização obtidas.

Figura 4 - Taxa de colonização intrarradicular de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares após oito semanas de cultivo em baixo P (20 mg kg^{-1}) e alto P (200 mg kg^{-1}). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos com baixo e alto P dentro de cada tratamento de inoculação. Letras minúsculas são usadas para comparar as médias dos tratamentos de inoculação dentro do mesmo nível de P. Os dados são médias de dez repetições.

4.3 Separação de proteínas por eletroforese em condições desnaturantes

A Figura 5 representa o perfil de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar após eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%)-SDS. Os proteomas apresentaram perfis de distribuição de bandas muito semelhantes, com massa molecular aparente variando de 10 kDa a 100 kDa. As proteínas de massas 60, 17 e 15 kDa foram as mais abundantes, e foram detectadas em todos os tratamentos, representando, em média, 12%, 18% e 12% do total de proteínas contidas no FI, respectivamente. Esses valores de abundância relativa podem sofrer variações de acordo com o tratamento estabelecido. Por estarem presentes em todos os casos analisados, é provável que estas proteínas sejam de origem vegetal.

A proteína de massa 25 kDa, presente somente no FI de raízes colonizadas por *G. clarum*, independente do nível de P, pode ser de origem fúngica, ou uma proteína vegetal induzida em resposta à interação com a referida espécie.

A proteína de 34 kDa, presente somente no FI de raízes colonizadas por *G. etunicatum* cultivadas em condições de alto P, é possivelmente uma proteína modulada pela concentração de P. Pode ser uma proteína vegetal induzida em raízes micorrizadas por *G. etunicatum* em resposta ao P; ou uma proteína fúngica induzida pelo P. Apesar de a colonização por *G. etunicatum* ter sido afetada pelo P, e ser possível que essa proteína esteja associada ao controle do processo de colonização das raízes pelo fungo, a análise do proteoma do FI das raízes colonizadas por esta espécie não foi objeto de estudo deste trabalho.

Figura 5 - Perfil de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares e cultivadas em condições de baixo P ou alto P, separadas em gel de poliacrilamida (12,5%) desnaturante. Quantidades iguais de proteínas foram utilizadas (4 μ g). **MM**: marcador de massa molecular. **BP**: FI de plantas cultivadas em condições de baixo P; **AP**: FI de plantas cultivadas em condições de alto P; **Ni**: FI de plantas não inoculadas; **Gc**: FI de plantas inoculadas com *G. clarum*; **Ge**: FI de plantas inoculadas com *G. etunicatum*; **Gr**: FI de plantas inoculadas com *G. rosea*. As setas indicam proteínas mais abundantes ou únicas em cada tratamento.

4.4 Análise do proteoma do FI de raízes por eletroforese bidimensional

A análise do proteoma do FI foi feita somente nas amostras de raízes não-colonizadas e raízes colonizadas por *G. clarum*, já que essa interação apresentou resposta mais contrastante quanto à colonização intrarradicular nas diferentes condições de P.

As proteínas detectadas no FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em baixo nível de P (NiBP), inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto nível de P (GcBP), não-inoculadas e cultivadas em alto nível de P (NiAP) e inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto nível de P (GcAP), podem ser vistas nas figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente. A maioria das proteínas detectadas apresenta pI entre 4,0 e 6,0, e massa molecular aparente variando de aproximadamente 14 kDa a 87 kDa.

4.4.1 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de baixo P

Na Figura 10 são apresentados os mapas das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de baixo P, separadas por eletroforese bidimensional e detectadas por impregnação com prata. No FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em baixo P foram detectadas 36 proteínas (Figura 10 A), enquanto que no FI de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em baixo P, foram detectadas 43 proteínas (Figura 10 B). As proteínas detectadas no FI desses dois tratamentos recebem a mesma numeração em ambos os géis.

A análise comparativa do proteoma do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* cultivadas em baixo nível de P, usando como referência plantas não-inoculadas e cultivadas na mesma concentração de P,

Figura 6 - Eletroforese bidimensional de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas, cultivadas em condições de baixo P. Foram utilizados 100 μ g de proteínas. A visualização das proteínas foi feita por impregnação com prata.

Figura 7 - Eletroforese bidimensional de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de baixo P. Foram utilizados 100 μ g de proteínas. A visualização das proteínas foi feita por impregnação com prata. A mancha apontada com a seta é um artefato de coloração do gel.

Figura 8 - Eletroforese bidimensional de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas, cultivadas em condições de alto P. Foram utilizados 100 μ g de proteínas. A visualização das proteínas foi feita por impregnação com prata.

Figura 9 - Eletroforese bidimensional de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de alto P. Foram utilizados 100 μ g de proteínas. A visualização das proteínas foi feita por impregnação com prata.

Figura 10 - Mapa das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar, separadas por eletroforese bidimensional. **A:** Proteínas detectadas no FI de plantas não-inoculadas, em condições de baixo P. **B:** Proteínas detectadas no FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P. A mancha apontada com a seta é um artefato de coloração do gel.

pode ser vista na Figura 11. A colonização das raízes com *G. clarum* resultou na supressão ($\geq 50\%$) do acúmulo de 5 proteínas (5, 7, 8, 18 e 35), indução ($\geq 50\%$) do acúmulo de 4 proteínas (16, 19, 25 e 29). O total de proteínas que não tiveram seu acúmulo alterado foi de 21. Das proteínas detectadas, 13 são únicas do FI de plantas inoculadas (37 a 49). Essas proteínas representam micorrizas putativas, isto é, proteínas vegetais ou fúngicas expressas unicamente em raízes colonizadas, ou proteínas fúngicas extracelulares.

A comparação do proteoma do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas com o de raízes inoculadas com *G. clarum*, ambos cultivados em baixo P, pode ser vista na Figura 12. Essa comparação revelou que 6 proteínas (1, 2, 3, 9, 10 e 32) estão presentes somente no FI de plantas não-inoculadas, e podem representar proteínas vegetais cujos genes não são expressos em raízes colonizadas por *G. clarum*.

Os valores de pI e massa molecular aparente, assim como abundância relativa e variação percentual do acúmulo das proteínas detectadas nas situações supra mencionadas, estão apresentados na Tabela 1.

4.4.2 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de alto P

As proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de alto P, separadas por eletroforese bidimensional e detectadas por impregnação com prata estão representadas na Figura 13. No FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em alto P foram detectadas 44 proteínas (Figura 13 A), enquanto que no FI de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas na mesma concentração de P, foram detectadas 36 proteínas (Figura 13 B). Para ambas situações, as proteínas receberam a mesma numeração.

Figura 11 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento não-inoculado. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes inoculadas. A mancha apontada com a seta é um artefato de coloração do gel.

Figura 12 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento inoculado. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de plantas não-inoculadas.

Tabela 1. Caracterização das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP).

Proteína	pI	MMA (kDa)	Abundância Relativa (%)			Proteína	pI	MMA (kDa)	Abundância Relativa (%)		
			Ni BP	Gc BP	Δ %				Ni BP	Gc BP	Δ %
1	5,35	86,83	0,18	nd	-	26	6,26	28,46	0,72	0,49	-31,89
2	5,25	85,39	0,90	nd	-	27	6,02	28,53	0,23	0,17	-26,99
3	5,17	84,26	0,49	nd	-	28	4,75	24,76	0,98	1,00	2,87
4	4,80	60,93	12,73	11,70	-8,14	29	4,58	24,80	0,32	0,51	61,32
5	5,07	63,55	2,32	0,46	-80,36	30	4,96	24,29	0,28	0,34	23,30
6	5,13	63,84	0,46	0,53	14,75	31	5,85	23,04	0,22	0,22	-3,59
7	5,02	63,22	2,33	0,03	-98,63	32	4,83	20,92	0,05	-	nd
8	4,98	62,34	1,53	0,05	-96,73	33	4,90	18,41	1,51	1,16	-23,45
9	4,95	60,02	0,41	nd	-	34	4,32	17,58	19,36	17,67	-8,74
10	4,91	59,52	0,16	nd	-	35	5,32	16,95	0,75	0,35	-53,07
11	4,70	58,26	1,00	1,06	5,81	36	4,32	15,58	13,52	11,99	-11,26
12	5,25	56,04	1,17	0,96	-17,92	37	4,71	64,43	nd	1,27	-
13	5,06	55,06	6,20	5,07	-18,11	38	4,31	61,78	nd	1,24	-
14	4,92	54,15	9,70	8,13	-16,15	39	4,29	58,26	nd	0,59	-
15	4,81	53,65	2,90	3,57	23,09	40	4,73	56,10	nd	0,17	-
16	4,55	37,88	1,83	3,12	71,12	41	4,3	39,92	nd	0,47	-
17	4,49	37,47	8,32	9,87	18,74	42	4,4	39,70	nd	0,70	-
18	4,46	36,01	0,57	0,08	-85,61	43	4,56	36,79	nd	0,25	-
19	4,45	37,94	0,20	4,54	2182,91	44	5,81	29,93	nd	0,12	-
20	4,49	35,28	1,94	2,20	13,49	45	4,39	28,98	nd	0,08	-
21	4,38	33,57	0,42	0,59	42,79	46	6,32	28,60	nd	0,04	-
22	4,38	30,48	3,66	2,75	-24,98	47	4,64	27,99	nd	0,32	-
23	4,67	30,04	0,36	0,34	-5,26	48	4,3	25,68	nd	2,24	-
24	4,60	30,05	0,26	0,23	-12,12	49	4,72	24,91	nd	0,08	-
25	4,32	29,43	2,05	3,24	58,26						

Δ %, variação percentual da abundância relativa; MMA, massa molecular aparente; nd, não detectado.

Figura 13 - Mapa das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar, separadas por eletroforese bidimensional. **A:** Proteínas detectadas no FI de plantas não-inoculadas, em condições de alto P. **B:** Proteínas detectadas no FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, em condições de alto P.

A análise comparativa das proteínas do FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, em relação a plantas não-inoculadas, ambas cultivadas em alto P, pode ser vista na Figura 14. A colonização das raízes com *G. clarum* resultou na supressão ($\geq 50\%$) do acúmulo de 9 proteínas (11, 21, 23, 24, 26, 27, 38, 39 e 40), e na indução ($\geq 50\%$) do acúmulo de 5 proteínas (1, 6, 9, 19 e 29). O acúmulo de 10 proteínas não foi alterado em função da inoculação com *G. clarum*; enquanto que 12 proteínas (45 a 56) foram detectadas somente no FI de plantas inoculadas. Essas proteínas representam micorrizinas putativas ou proteínas fúngicas extracelulares.

A Figura 15 mostra a análise comparativa das proteínas do FI de plantas não-inoculadas, usando como referência as proteínas do FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, ambas cultivadas em condições de alto P. Essa comparação revelou que 20 proteínas (2, 7, 8, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 41, 42, 43 e 44) estão presentes somente no FI de plantas não-inoculadas e podem representar proteínas vegetais cujos genes não são expressos em raízes colonizadas por *G. clarum*.

Os valores de pI, massa molecular aparente, abundância relativa e variação percentual da abundância relativa, das proteínas do FI de plantas não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, em condições de alto P, são apresentados na Tabela 2.

Figura 14 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com *G. clarum*, em condições de alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento não-inoculado. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes inoculadas.

Figura 15 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com *G. clarum*, em condições de alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento inoculado. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes não-inoculadas.

Tabela 2. Caracterização das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de alto P (AP).

Abundância Relativa (%)						Abundância Relativa (%)					
Proteína	pI	MMA (kDa)	Ni AP	Gc AP	Δ %	Proteína	pI	MMA (kDa)	Ni AP	Gc AP	Δ %
1	4,66	62,06	3,83	6,44	68,24	29	4,32	16,43	9,90	15,95	61,07
2	4,32	61,51	0,18	nd	-	30	5,62	16,66	0,84	nd	-
3	5,11	57,77	0,46	0,61	34,35	31	6,22	42,88	0,85	nd	-
4	4,93	56,82	3,44	5,07	47,47	32	6,64	38,67	0,36	nd	-
5	4,79	56,28	5,08	7,29	43,67	33	5,69	24,88	0,52	nd	-
6	4,68	55,76	1,12	2,16	92,77	34	5,70	22,99	0,37	nd	-
7	6,37	42,38	0,62	nd	-	35	5,77	27,76	0,28	nd	-
8	4,47	41,52	0,32	nd	-	36	4,53	30,46	2,74	1,62	-40,95
9	4,39	41,72	1,50	3,91	160,81	37	4,48	30,47	1,25	1,24	-0,24
10	4,40	38,53	12,27	9,65	-21,31	38	4,64	25,90	1,39	0,09	-93,54
11	4,43	37,09	1,64	0,37	-77,38	39	5,16	17,36	0,96	0,36	-62,79
12	4,40	36,33	3,03	2,89	-4,46	40	4,76	18,88	1,90	0,85	-54,96
13	4,54	30,58	0,85	nd	-	41	5,00	14,29	2,49	nd	-
14	4,34	31,00	3,86	2,51	-34,95	42	5,43	14,62	1,35	nd	-
15	5,16	30,04	0,47	nd	-	43	4,92	18,61	1,21	nd	-
16	4,70	29,82	0,54	nd	-	44	4,92	17,83	1,54	nd	-
17	4,92	29,59	0,80	nd	-	45	5,17	64,91	nd	0,51	-
18	4,99	29,48	0,31	nd	-	46	5,11	64,85	nd	0,39	-
19	4,30	29,97	0,97	3,38	247,43	47	4,43	42,67	nd	0,08	-
20	6,22	28,18	0,59	nd	-	48	4,34	40,25	nd	1,49	-
21	6,17	28,00	2,79	1,30	-53,37	49	4,43	39,56	nd	2,35	-
22	4,35	28,61	2,53	1,40	-44,89	50	4,54	39,21	nd	3,76	-
23	6,28	27,97	1,62	0,49	-69,78	51	4,38	35,14	nd	0,43	-
24	5,90	27,96	1,16	0,39	-66,47	52	4,55	32,65	nd	0,22	-
25	6,23	27,38	0,36	nd	-	53	4,55	30,58	nd	0,04	-
26	5,72	22,36	1,56	0,56	-64,02	54	4,33	25,92	nd	2,29	-
27	5,72	19,69	2,17	0,32	-85,16	55	4,72	23,89	nd	0,19	-
28	4,31	18,18	17,98	19,31	7,37	56	4,97	24,98	nd	0,09	-

Δ %, variação percentual da abundância relativa; MMA, massa molecular aparente; nd, não detectado.

4.4.3 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas, cultivadas em condições de baixo P ou alto P

As proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo P ou alto P, separadas por eletroforese bidimensional e detectadas por impregnação com prata estão representadas na Figura 16. No FI de plantas não-inoculadas em baixo P foram detectadas 36 proteínas (Figura 16 A), e em alto P, 44 proteínas (Figura 16 B). Para ambas situações, as proteínas receberam a mesma numeração.

A análise comparativa das proteínas do FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em alto P, em relação a baixo P, pode ser vista na Figura 17. O aumento da concentração de P no substrato de cultivo resultou na supressão ($\geq 50\%$) do acúmulo de 5 proteínas (4, 11, 12, 15 e 25), e na indução ($\geq 50\%$) do acúmulo de 7 proteínas (18, 20, 23, 24, 26, 27 e 31). O acúmulo de 8 proteínas não foi alterado em função do aumento de P; enquanto que 24 proteínas (37 a 60) foram detectadas somente no FI de plantas não-inoculadas em condições de alto P. Esses dados sugerem que o aumento de P em plantas não-inoculadas induz a síntese de proteínas vegetais específicas, as quais poderiam estar envolvidas, direta ou indiretamente, no controle das MAs.

A Figura 18 mostra a análise comparativa das proteínas do FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em baixo P, usando como referência as proteínas do FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em condições de alto P. Essa comparação revelou que 16 proteínas estão presentes somente no FI de raízes das plantas não-inoculadas e cultivadas em baixo P. Essas proteínas podem ter importante papel no controle das MAs e devem ser melhor caracterizadas.

Figura 16 - Mapa das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar, separadas por eletroforese bidimensional. **A:** Proteínas detectadas no FI de plantas não-inoculadas, em condições de baixo P. **B:** Proteínas detectadas no FI de plantas não-inoculadas, em condições de alto P.

Figura 17 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas em condições de baixo e alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento baixo P. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes cultivadas em alto P.

Figura 18 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas em condições de baixo e alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento alto P. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes cultivadas em baixo P.

Os valores de pI, massa molecular aparente, abundância relativa e variação percentual da abundância relativa, das proteínas do FI de plantas não-inoculadas e cultivadas em condições de baixo ou alto P, são apresentados na Tabela 3.

4.4.4 Caracterização do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de baixo P ou alto P

As proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, cultivadas em condições de baixo P ou alto P, separadas por eletroforese bidimensional e detectadas por impregnação com prata estão representadas na Figura 19. No FI de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em baixo P, foram detectadas 43 proteínas (Figura 19 A), enquanto que nas condições de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto P, foram detectadas 36 proteínas (Figura 19 B). As proteínas detectadas para essas duas condições recebem uma mesma numeração em ambos os géis.

A Figura 20 mostra a análise comparativa das proteínas do FI de plantas cultivadas em condições de alto P, usando como referência as proteínas do FI de plantas cultivadas em baixo P, ambas inoculadas com *G. clarum*. O aumento da concentração de P no substrato de cultivo resultou na supressão ($\geq 50\%$) do acúmulo de 2 proteínas (36 e 37), e na indução ($\geq 50\%$) do acúmulo de 10 proteínas (16, 20, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 38 e 39). Um total de 19 proteínas tiveram seu acúmulo inalterado em função do aumento de P, enquanto que 5 proteínas (44 a 48) estão presentes somente no FI de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em alto P, podendo representar proteínas vegetais produzidas em resposta à infecção fúngica, que sejam responsáveis pelo impedimento do crescimento intrarradicular de FMAs em plantas cultivadas com alto nível de P.

Tabela 3. Caracterização das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas (Ni) e cultivadas em condições de baixo (BP) ou alto (AP).

Proteína	pI	MMA (kDa)	Abundância Relativa (%)			Proteína	pI	MMA (kDa)	Abundância Relativa (%)		
			Ni BP	Ni AP	Δ %				Ni BP	Ni AP	Δ %
1	5,35	86,83	0,18	nd	-	31	5,70	22,34	0,22	1,56	600,45
2	5,25	85,39	0,90	nd	-	32	4,83	20,92	0,05	nd	-
3	5,17	84,26	0,49	nd	-	33	4,75	18,39	1,51	1,90	25,23
4	4,64	60,31	12,73	3,83	-69,95	34	4,31	17,58	19,36	17,98	-7,12
5	5,10	62,88	2,32	nd	-	35	5,16	17,00	0,75	0,96	28,61
6	5,16	63,13	0,46	nd	-	36	4,32	15,90	13,52	9,90	-26,75
7	5,05	62,45	2,33	nd	-	37	6,37	42,38	nd	0,62	-
8	5,00	62,20	1,53	nd	-	38	4,47	41,52	nd	0,32	-
9	4,95	60,02	0,41	nd	-	39	4,30	41,29	nd	1,50	-
10	4,91	59,52	0,16	nd	-	40	4,54	30,58	nd	0,85	-
11	4,50	59,02	1,00	0,18	-81,88	41	5,16	30,04	nd	0,47	-
12	5,09	56,19	1,17	0,46	-61,01	42	4,70	29,82	nd	0,54	-
13	4,91	55,05	6,20	3,44	-44,51	43	4,92	29,59	nd	0,80	-
14	4,76	54,06	9,70	5,08	-47,65	44	4,99	29,48	nd	0,31	-
15	4,65	53,32	2,90	1,12	-61,34	45	6,22	28,18	nd	0,59	-
16	4,53	51,79	1,82	nd	-	46	4,30	27,99	nd	2,53	-
17	4,40	37,34	8,32	12,27	47,54	47	6,07	27,96	nd	1,62	-
18	4,40	36,28	0,57	1,64	187,72	48	6,23	27,38	nd	0,36	-
19	4,44	36,87	0,20	nd	-	49	5,52	19,84	nd	2,17	-
20	4,40	35,04	1,94	3,03	55,82	50	5,62	16,66	nd	0,84	-
21	4,39	32,43	0,42	nd	-	51	6,22	42,88	nd	0,85	-
22	4,34	29,95	3,66	3,86	5,30	52	6,64	38,67	nd	0,36	-
23	4,52	29,59	0,36	2,74	659,00	53	5,69	24,88	nd	0,52	-
24	4,46	29,57	0,26	1,25	372,73	54	5,70	22,99	nd	0,37	-
25	4,30	29,00	2,05	0,97	-52,49	55	5,77	27,76	nd	0,28	-
26	6,13	28,10	0,72	2,79	290,49	56	4,50	26,26	nd	1,39	-
27	5,87	28,01	0,23	1,16	414,60	57	5,00	14,29	nd	2,49	-
28	4,74	24,04	0,98	nd	-	58	5,43	14,62	nd	1,35	-
29	4,56	24,06	0,32	nd	-	59	4,92	18,61	nd	1,21	-
30	4,96	23,63	0,28	nd	-	60	4,92	17,83	nd	1,54	-

Δ %, variação percentual da abundância relativa; MMA, massa molecular aparente; nd, não detectado.

Figura 19 - Mapa das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar, separadas por eletroforese bidimensional. **A:** Proteínas detectadas no FI de plantas inoculadas com *G.clarum*, em condições de baixo P. **B:** Proteínas detectadas no FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, em condições de alto P. A mancha apontada com a seta é um artefato de coloração do gel.

Figura 20 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo e alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento baixo P. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes cultivadas em alto P.

A análise comparativa das proteínas do FI de raízes das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em baixo nível de P, usando como referência plantas cultivadas em alto nível de P, ambas inoculadas com *G. clarum*, pode ser vista na Figura 21. Essa comparação revelou que 12 proteínas (2, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 22, 28, 33 e 35) estão presentes somente no FI de plantas inoculadas com *G. clarum* e cultivadas em condições de baixo P e podem representar proteínas vegetais cujos genes não são expressos em raízes colonizadas por *G. clarum*.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de pI, massa molecular aparente, abundância relativa e variação percentual da abundância relativa, das proteínas do FI de plantas inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P ou alto P.

O resumo da análise quantitativa dos proteomas de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas ou inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo P ou alto P pode ser visto na Figura 22.

Proteínas únicas no FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas e reguladas pelo P, passam de 12,2%, quando cultivadas em condições de baixo P, para 35,7% em condições de alto P (Figura 22 A e B). Ou seja, as condições de alta concentração de P alteram a síntese de uma grande quantidade de proteínas que poderiam estar envolvidas no controle do desenvolvimento das MAs. Ainda como efeito do aumento da concentração de P, há uma diminuição do total de proteínas únicas de raízes não-inoculadas.

O aumento do número de proteínas suprimidas pela micorrização, em função do aumento de P no substrato, indica que essas proteínas também podem ter papel importante no controle do desenvolvimento das MAs e podem ser reguladas pela disponibilidade de P (Figura 22 A e B).

Figura 21 - Mapa comparativo de proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum*, em condições de baixo e alto P. O mapa de referência utilizado para a comparação foi o do tratamento alto P. Manchas vermelhas indicam proteínas com acúmulo induzido ($\geq 50\%$). Manchas verdes indicam proteínas com acúmulo suprimido ($\geq 50\%$). Manchas azuis circuladas indicam proteínas com acúmulo inalterado. Manchas azuis representam proteínas presentes somente no FI de raízes

Tabela 4. Caracterização das proteínas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* (Gc) e cultivadas em condições de baixo P (BP) ou alto P (AP).

Abundância Relativa (%)						Abundância Relativa (%)					
Proteína	pI	MMA (kDa)	Gc BP	Gc AP	Δ %	Proteína	pI	MMA (kDa)	Gc BP	Gc AP	Δ %
1	4,82	62,69	11,70	6,44	-44,97	25	4,61	30,95	0,23	1,24	436,64
2	4,71	64,43	1,27	nd	-	26	4,68	30,90	0,34	1,62	373,10
3	5,13	64,72	0,53	0,51	-3,78	27	4,32	30,39	3,24	3,38	4,29
4	5,08	64,53	0,46	0,39	-14,29	28	5,81	29,93	0,12	nd	-
5	4,99	64,00	0,03	nd	-	29	4,39	29,10	0,08	1,40	1561,90
6	4,31	61,78	1,24	nd	-	30	6,04	28,48	0,16	0,39	136,36
7	4,95	62,48	0,05	nd	-	31	6,30	28,36	0,49	1,30	167,35
8	4,72	59,99	1,06	nd	-	32	6,41	28,29	0,04	0,49	1221,62
9	4,29	58,26	0,59	nd	-	33	4,64	27,99	0,32	nd	-
10	5,27	57,62	0,96	0,61	-36,17	34	4,32	25,80	2,24	2,29	2,14
11	5,09	56,83	5,07	5,07	-0,08	35	4,60	25,54	0,51	nd	-
12	4,94	56,37	8,13	7,29	-10,32	36	4,76	25,51	1,00	0,09	-91,43
13	4,83	56,09	3,57	2,16	-39,46	37	4,96	24,97	0,34	0,09	-72,67
14	4,73	56,10	0,17	nd	-	38	4,72	24,40	0,08	0,19	130,49
15	4,30	39,92	0,47	nd	-	39	5,87	23,06	0,22	0,56	161,40
16	4,37	39,97	0,70	1,49	114,04	40	4,91	18,90	1,16	0,85	-26,32
17	4,49	38,66	9,87	9,65	-2,22	41	4,32	18,18	17,67	19,31	9,28
18	4,44	39,28	4,54	2,35	-48,29	42	4,33	16,12	11,99	15,95	32,97
19	4,55	39,07	3,12	3,76	20,40	43	5,32	17,31	0,35	0,36	1,99
20	4,55	36,94	0,25	0,37	50,20	44	4,43	42,67	nd	0,08	-
21	4,49	36,57	2,20	2,89	31,17	45	4,48	42,16	nd	3,91	-
22	4,45	36,53	0,08	nd	-	46	4,55	32,65	nd	0,22	-
23	4,37	34,92	0,59	0,43	-27,61	47	4,55	30,58	nd	0,04	-
24	4,38	31,53	2,75	2,51	-8,70	48	5,91	19,54	nd	0,32	-

Δ %, variação percentual da abundância relativa; MMA, massa molecular aparente; nd, não detectado.

Figura 22 - Alterações no proteoma do FI 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). **A**: Comparação dos proteomas de NiBP e GcBP. **B**: Comparação dos proteomas de NiAP e GcAP. **C**: Comparação dos proteomas de NiBP e NiAP. **D**: Comparação dos proteomas de GcBP e GcAP.

Quando se compara as proteínas do FI induzidas pelo aumento de P em plantas não micorrizadas com proteínas do FI induzidas pelo aumento de P em plantas micorrizadas, observa-se um aumento de aproximadamente 2 vezes (Figura C e D). Essas proteínas poderiam estar atuando de forma direta ou indireta na regulação do desenvolvimento das MAs em função da disponibilidade de P.

A predominância de proteínas ácidas no FI das raízes de cana-de-açúcar, vem confirmar relatos na literatura sobre a presença dessas proteínas na região apoplástica de folhas de citros (Biles & Abeles, 1991), ervilha e cevada (Trudel et al., 1998) e raízes de cenoura (Smallwood, et al., 1999), entre outros sistemas.

Para compreensão dos mecanismos que regulam MAs várias técnicas têm sido usadas (Harrison, 1999). As comparações iniciais dos perfis de proteínas de raízes não-colonizadas e raízes colonizadas indicam a presença de novas proteínas em raízes micorrizadas, mas não permitem a diferenciação entre proteínas fúngicas e proteínas de origem vegetal, induzidas pela colonização intrarradicular (Arines, et al., 1993; Garcia-Garrido, et al., 1993; Samra, et al., 1997). A expressão gênica diferencial pode ser melhor resolvida quando são feitas comparações com as sequências genômicas de cada simbionte (Harrison, 1999).

Apesar da identificação de genes diferencialmente regulados em raízes micorrizadas fornecer informações iniciais sobre os mecanismos que controlam o desenvolvimento das MAs, o pleno entendimento dos mesmos só ocorrerá após a identificação das proteínas codificadas por esses genes e determinação de suas respectivas funções (Harrison, 1999).

O uso de estudos de proteomas tem sido utilizado para identificar produtos gênicos expressos de forma diferencial em outras interações simbióticas. Usando 2D-PAGE, Martin & Hilbert (1991) identificaram proteínas

expressas diferencialmente em raízes de eucalipto colonizadas por fungos ectomicorrízicos em relação raízes não-colonizadas. Posteriormente, uma dessas proteínas foi identificada como sendo uma hidrofobina fúngica (Hilbert et al., 1991). No entanto, Guttenberger & Hampp (1992) argumentam que em muitos casos, o acúmulo diferencial de proteínas detectado por eletroforese bidimensional pode ser uma artefato da técnica e não uma alteração verdadeira de abundância.

Usando 2D-PAGE e sequenciamento de Edman, Natera et al., (2000) identificaram proteínas bacterianas e de bacterióides envolvidas no metabolismo do Nitrogênio e do Carbono na interação de *Sinorhizobium meliloti* com trevo. Proteínas da membrana peribacterióide em soja foram isoladas de nódulos radiculares fixadores de Nitrogênio e submetidas a sequenciamento do N terminal (Panter, et al., 2000). Das dezessete proteínas que foram caracterizadas, seis são homólogas a proteínas de função já conhecida.

A identificação e caracterização de proteínas por sequenciamento de Edman e espectrometria de massa é acelerada pela disponibilidade de sequências genômicas ou ESTs do organismo em estudo. A eletroforese bidimensional é a ferramenta central para estudos de proteomas de plantas e seus órgãos, microrganismos e a interação destes últimos com vegetais (Wijk, 2001). No entanto, dependendo do sistema estudado, são encontradas dificuldades experimentais tanto para o processamento do extrato protéico, como para as análises subsequentes (Washburn & Yates, 2000).

Algumas dificuldades são encontradas na análise do proteoma do FI de raízes. A concentração de proteínas no FI é normalmente baixa, havendo a necessidade do processamento de uma grande quantidade de material vegetal. A baixa quantidade de proteínas obtidas nos experimentos dificultou as análises e não permitiu a caracterização de proteínas com acúmulo diferencial por sequenciamento ou espectrometria de massa.

A caracterização das proteínas com acúmulo diferencial no FI de raízes micorrizadas por espectrometria de massa e microsequenciamento do N-terminal poderá contribuir para definir suas possíveis funções nas MAs.

5 CONCLUSÕES

Através da análise comparativa dos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar por eletroforese bidimensional, pode-se concluir que:

- 1) No FI de raízes de cana-de-açúcar predominam proteínas ácidas;
- 2) Das 49 proteínas detectadas nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar, em condições de baixo P, 8,2% apresentaram acúmulo induzido e 10,2% acúmulo suprimido, de pelo menos 50%, pela colonização com *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado.
- 3) 13 proteínas foram detectadas somente no FI de raízes de plantas inoculadas, em condições de baixo P;
- 4) Das 56 proteínas detectadas nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar, em condições de alto P, 8,9% apresentaram acúmulo induzido e 16,1% acúmulo suprimido, de pelo menos 50%, pela colonização com *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado;
- 5) 12 proteínas foram detectadas somente no FI de raízes de plantas inoculadas, em condições de alto P;
- 6) Nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar não-inoculadas foram detectadas 16 proteínas únicas de condições de baixo P e 24 proteínas únicas de condições de alto P;
- 7) Nos proteomas do FI de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *G. clarum* foram detectadas 12 proteínas únicas de condições de baixo P e 5 proteínas únicas de condições de alto P.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C.; GEURTS, R.; LAPEYRIE, F.; BISSELING, T. Endomycorrhizae and rhizobial nod factors activated signal transduction pathway inducing PsENOD5 and PsENOD12 expression in which Sym8 is a common step. **Plant Journal**, v.15, p. 605-614, 1998.

ARINES, J.; PALMA, J.M.; VILARINO, A. Comparasion of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. **New Phytologist**, v.123, p. 763-768, 1993.

AVIO, L.; GIOVANNETTI, M. The protein pattern of spores of arbuscular mycorrhizal fungi: comparasion os species, isolados and physiological stages. **Mycology Research**, v.102, n.8, p. 985-990,1998.

BALESTRINI, R.; PEROTTO, S.; GASVERDE, E.; DAHIYA, P.; GULDMANN, L.L.; BREWIN, N.J.; BONFANTE, P. Transcription of a gene encoding a lectinlike glycoprotein is induced in root cells harboring arbuscular mycorrhizal fungi in *Pisum sativum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p. 785-791, 1999.

BILES, C.L.; ABELES, F.B. Xylem sap protein. **Plant Physiology**, v.96, n.2 p.597-601, 1991.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v.8, n.2, p.93-95, 1987.

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

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

DAVID, R.; ITZAHAKI, H.; GINZBERG, I.; GAFNI, Y.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p. 489-497, 1998.

DUC, D.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc⁻) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). **Plant Science**, v.60, p. 215-222, 1989.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO **Agrianual 2001**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2000. p.248-264: Cana-de-açúcar.

FRÜHLING, M.; ROUSSEL, H.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; PÜHLER, A.; PERLICK, A.M. The *Vicia faba* leghemoglobin gene Vflh29 is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p. 124-131, 1997.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; TORO, N.; OCAMPO, J.A. Presence of specific polypeptide in onion roots colonized by *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, v.2, p. 175-177, 1993.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GOLLOTTE, A.; LHERMINER, J.; TISSERANT, B.; FRANKEN, P.; DUMAS-GAUDOT, E.; LEMOINE, M.C.; VAN TINEN, D.; GIANINAZZI, S. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. **Canadian Journal Botany**, v.73, p. 526-532, 1995.

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

GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESER, J.; GUNTHER, S.; STRAHLER, J.R.; HANASH, S.M.; SOMERLOT, L. Elimination of point streaking on silver-stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. **Electrophoresis**, v.8, n.2, p.122-124, 1987.

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**, v.68, p. 458-552, 1981.

GUERREIRO, N.; REDMOND, J.W.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant - Microbe Interactions**, v.10, n.4, p. 506-516, 1997.

GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins - symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas? **Planta**, v.188, p.129-136, 1992.

HAHN, M.; MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.322-327, 2001.

HAMMOND-KOSACK, E.K. Preparation and analysis of intercellular fluid. In: GURR,S.J.; McPHERSON, M.J.; BOWLES, D.J. **Molecular plant pathology**. Oxford: Oxford University, 1992, v. 2, p. 15-21.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483 p.

HARRISON, M.J. Development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.360-365, 1998.

HARRISON, M.J. Molecular and cellular aspects of arbuscular mycorrhizae. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p. 361-389, 1999.

HARRISON, M.J.; DIXON, R.A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p. 643-654, 1993.

HARRISON, M.J.; DIXON, R.A. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during the interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Plant Journal**, v.6, p. 9-20, 1994.

HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. Early ectomycorrhizins and polypeptide cleansing in eucalypt ectomycorrhizas. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991

INTERNATIONAL CULTURE COLLECTION OF ARBUSCULAR & VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. **Taxonomy**. http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/clasiffication/htm (05 fev. 2002).

KOIDE, R.T.; LI, M. On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p. 557-581, 1990.

LABORATORIOS AL DE MEXICO SA de CV. **Fertilizacion de caña de azucar (*Saccharum officinarum* L.)**. InfoAgro: <http://www.al-labs.com.mx/DOC/1g.htm> (05 fev. 2002).

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

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 Phytopathological Society Press, 1999. p.46-60.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p. 75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal Botany**, v.73, p.533-540, 1995.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanase expression. **New Phytologist**, v.134, p. 531-538, 1996.

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

LUCCHESI, A.A. Processos fisiológicos da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Boletim Técnico ESALQ/CENA**, n. 7, p. 1-50, 1995.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Metodologia para análise de elementos em material vegetal. In: MALAVOLTA, E., VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997, p. 231-308.

- MARTIN, F.; HILBERT, J.L. Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. **Experientia**, v.47, p.321-331, 1991.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [*Citrus limonia* (L.) Osdeck] **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p. 767-775, 2000.
- MORANDI, D.; BAILEY, J.A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Physiology Plant Pathology**, v.24, p. 357-364, 1984.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of mycorrhizal fungi (zygomycetes): a new order, glomales, two new suborders, glomineae and gigasporineae, and two new families, acaulosporaceae and gigasporaceae, with an amendment of glomaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.
- NATERA, S.H.A.; GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.9, p. 995-1009, 2000.
- PANTER, S.; THOMSON, R.; BRUXELLES, G.; LAVER, D.; TREVASKIS, B.; UDVARDI, M. Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.13, p. 325-333, 2000.
- O'FARRELL, P.H. High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, p. 4007-4021, 1975.

ORGANIZAÇÃO DE PLANTADORES DE CANA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Perfil. http://www.orplana.com.br/perf_prod/htm (05 fev. 2002).

REDECKER, D.; KODNER, R. & GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v.289, p.1920-1921, 2000.

RHIJN, M.L.; FANG, Y.; GALILI, S.; SHAUL, 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 Academy of Science of the USA**, v.94, p. 467-472, 1997.

ROMERO, A.G.F. Avaliação agrônômica de formulações de isoflavonóide estimulante da micorrizaçãono milho (*Zea mays* L.). Lavras, 1999. 40 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

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.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, v. 116, p.447-453, 1998.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.

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: Ministério da Educação; Lavras: ESAL,FAEPE, 1988. 236 p.

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

SMALLWOOD, M.; WORRALL, D; BYASS, L.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; DOUCET, C.J.; HOLT, C.; TELFORD, J.; LILLFORD, P.; BOWLES, D.J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). **Biochemical Journal**, v. 340, p. 385-391, 1999.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, p. 221-244, 1988.

SMITH, S.E.; READ, D.J. (Ed.). **Mycorrhizal simbiosis**. San Diego: Academic Press, 1997. 605 p.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWING, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A.; BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porum*: regulation and localization. **Planta**, v.177, p. 447-455, 1989.

TRUDEL, J.; GRENIER, J.; POTVIN, C.; ASSELIN, A. Several thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans. **Plant Physiology**, v.118, p.1431-1438, 1998.

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

VOLPIN, H.; ELKIND, Y. OKON, Y.; KAPULNIK, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defense response in alfalfa roots. **Plant Physiology**, v.104, p. 683-689, 1994.

VOLPIN, H.; PHILLIPS, D.A.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Suppression of an Isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. **Plant Physiology**, v.108, p. 2598-2602, 1995.

WASHBURN, M.P.; YATES, J.R. Analysis of the microbial proteome. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p. 292-297, 2000.

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

WILKINSON, D.M. Mycorrhizal evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n. 2, p. 64-65, 2001.

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.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) in soybean roots. **Experientia**, v.47, p. 395-399, 1991.

WYSS, P.; MELLOR, R.B.; WIEMKEN, A. Mutants of soybean (*Glicine max*) unable to suppress nodulation in the presence of nitrate retain the ability to suppress mycorrhization in the presence of phosphate. **Journal Plant Physiology**, v.136, p. 507-509, 1990a.

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**, v.182, p. 22-26, 1990b.