**IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM MOLECULAR DE GENES COM
EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RAÍZES DE FUMO (*Nicotiana
tabacum*) INFECTADAS POR *Glomus intraradices***

RENATA FAVA DITT
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências,
Área de Concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Ditt, Renata Fava

Identificação e clonagem molecular de genes com expressão diferencial em raízes de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectadas por *Glomus intraradices* / Renata Fava Ditt. - Piracicaba, 1997.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Clonagem 2. Expressão gênica 3. Fumo 4. Micorriza arbuscular I. Título

CDD 633.71

**IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM MOLECULAR DE GENES COM
EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RAÍZES DE FUMO (*Nicotiana
tabacum*) INFECTADAS POR *Glomus intraradices***

RENATA FAVA DITT

Aprovada em: 30.06.1997

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sergio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. David Henry Moon

CENA/USP

Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS
Orientador

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, amizade e constante otimismo.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do Solo, Marcelo, Marco, Rogério, Arnaldo, Vânia, Robson, Winston, Lúcia, Leandra e Beth, e aos técnicos, Denise e Fernando, pelo apoio e amizade.

Às amigas Célia, Chirlei e Raquel, pela troca de informações “moleculares” e, principalmente, pelo carinho, amizade e bons momentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pelo constante incentivo e pelo ombro amigo.

Aos Professores Luis Eduardo A. Camargo, Luis L. Coutinho, Sergio F. Pascholati e aos pesquisadores do CENA David H. Moon e Claudia M. Bellato Meinhardt, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos e, principalmente, pelas experiências e conhecimentos transmitidos.

À Professora Maria Helena Goldman, (FORP-USP) e ao pesquisador Celso Benedetti (CEBMEG-UNICAMP), por terem auxiliado nas etapas radiativas do “differential display” e também pelas discussões enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. Raymond S. Pacovsky, pelas valiosas contribuições na discussão dos resultados.

À minha grande e amada família, meus pais Rubens e Cecília, meus irmãos Adriana, Paula e Flávio, meus cunhados João e José Eduardo e meu pequeno sobrinho Rodrigo, pelo orgulho que sentem e por apoiarem sempre, seja qual for o caminho que eu escolha.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos gerais.....	4
2.2. Desenvolvimento de micorrizas arbusculares.....	5
2.3. Biologia molecular de micorrizas arbusculares.....	11
2.3.1. Sinais moleculares	11
2.3.2. O sistema de defesa vegetal e o controle da simbiose.....	17
2.3.3. A transferência de nutrientes e a regulação da simbiose.....	22
2.4. Clonagem de genes diferencialmente expressos	27
2.4.1. Hibridização diferencial e hibridização subtrativa.....	27
2.4.2. “Display” diferencial	29
3. METODOLOGIA.....	33
3.1. Obtenção de raízes de fumo.....	33
3.1.1. Implantação do experimento	33
3.1.2. Coleta das amostras e determinação da colonização radicular	34
3.2. Extração de RNA total e RNA mensageiro.....	34
3.3. Síntese de cDNA.....	35
3.4. Amplificação do cDNA por PCR.....	36
3.4.1. Método 1: utilizando-se dois iniciadores.....	36
3.4.2. Método 2: utilizando-se um iniciador	37
3.5. Análise dos produtos de PCR.....	37

3.5.1. Em gel de poliacrilamida.....	37
3.5.2. Em gel de agarose.....	38
3.6. Isolamento dos cDNAs diferenciais	38
3.6.1. De gel de poliacrilamida	38
3.6.2. De gel de agarose.....	38
3.7. Confirmação da expressão diferencial por “dot blot”	39
3.8. Clonagem dos cDNAs.....	40
3.9. Sequenciamento dos cDNAs e análise das sequências.....	42
3.10. Confirmação da expressão diferencial.....	43
3.10.1. Análise de “northern blot” com sonda radiativa.....	43
3.10.2. Análise de “northern blot” com sonda marcada com DIG-dUTP .	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Obtenção de plantas de fumo e colonização radicular	46
4.2. Extração de RNA total.....	46
4.3. Análise dos cDNAs amplificados.....	48
4.3.1. Visualização dos cDNAs amplificados pelo Método 1, em gel de poliacrilamida.....	51
4.3.2. Visualização dos cDNAs amplificados pelo Método 2, em gel de agarose	54
4.4. Isolamento dos cDNAs diferenciais	55
4.4.1. De géis de poliacrilamida.....	55
4.4.2. De géis de agarose	59
4.5. Confirmação da expressão diferencial por “dot blot”	59
4.6. Clonagem dos cDNAs diferenciais.....	63
4.7. Sequenciamento dos cDNAs e análise das sequências.....	63
4.8. Confirmação da expressão diferencial.....	81
4.8.1. Hibridização em “northern blots” com sonda radiativa ou sonda marcada com DIG-11-dUTP	81

5. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICE	95

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Quantidades iguais de RNA total (3µg) extraído de raízes de fumo não-inoculadas (**Ni8**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi8**), 8 semanas após transplântio. **MM** - Marcador de massa molecular (“RNA ladder”, Gibco)..... 49

Figura 2. Quantidades iguais de RNA total (3µg), após tratamento com DNase. **MM** - Marcador de massa molecular (“RNA ladder”, Gibco); **Ni8** - não-inoculado e **Gi8** - inoculado com *Glomus intraradices*, 8 semanas após transplântio 50

Figura 3. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 1) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**), utilizando-se os iniciadores AP1/RP1. **MM** - Marcador de massa molecular (“Molecular marker” VIII, Boehringer Mannheim). Ni1 e Ni2, Gi1 e Gi2 constituem-se em produtos de amplificações independentes ... 52

Figura 4. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 1) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**), utilizando-se os iniciadores AP2/RP1. **MM** - Marcador de massa molecular (“Molecular marker” VIII, Boehringer Mannheim). As setas indicam possíveis cDNAs diferenciais 53

Figura 5. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 2) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**). O cDNA foi sintetizado com o iniciador AP1 e

amplificado com os iniciadores B03 ou B07, conforme indicado. O fragmento diferencial é indicado pela seta. **MM** - Marcador de massa molecular (“Molecular marker” VIII, Boehringer Mannheim)..... 56

Figura 6. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 2) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**). O cDNA foi sintetizado com o iniciador AP2 e amplificado com o iniciador B03. Os fragmentos diferenciais são indicados pelas setas. **MM** - Marcador de massa molecular (“Molecular marker” VIII, Boehringer Mannheim)..... 57

Figura 7. Resultado da eluição dos cDNAs diferenciais isolados de géis de agarose. **MM** - Marcador de massa molecular (“Low DNA mass ladder”, Gibco). NtGi1, NtGi2 e NtGi3 são diferentes cDNAs diferenciais provenientes da amplificação da primeira fita de cDNA de amostras de raízes micorrizadas por *Glomus intraradices* 60

Figura 8. Resultado da hibridização do produto total da amplificação dos cDNAs imobilizados em membranas de náilon, com os clones **NtGi1**, **NtGi2** ou **NtGi3**, marcados com DIG-11-dUTP. **Controle** - cDNA de cada clone; **Ni** - produto total da amplificação de amostras de cDNA de raízes não-inoculadas; **Gi** - produto total da amplificação de amostras de cDNA de raízes inoculadas com *Glomus intraradices* 62

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi1. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. O sinal * indica o códon de terminação. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor. 64

Figura 10. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi2. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. O sinal * indica o códon de terminação. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor. 65

Figura 11. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi3. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor 66

Figura 12. Resultado do alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones 1 - NtGi1, 2 - NtGi2 e 3 - NtGi3. As sequências em negrito correspondem a fragmentos do vetor 67

Figura 13. Resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones 1 - NtGi1, 2 - NtGi2 e 3 - NtGi3. As sequências em negrito correspondem a fragmentos do vetor 68

Figura 14. Resultado do alinhamento das proteínas deduzidas para os clones NtGi2 (linha 20) e NtGi3 (linha 19), com sequências de proteínas homólogas armazenadas em banco de dados. Linhas 1 a 3 - Hidrogenases de: 1. *Methanococcus jannaschii*; 2. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* e 3. *Bradyrhizobium japonicum*. Linhas 4 a 18 - Proteínas acessórias da urease (UreG) de: 4. *Arabidopsis thaliana*; 5. *Bacillus pasteurii*; 6. *Mycobacterium tuberculosis*; 7. *Streptococcus salivarius*; 8. *Bacillus* sp. TB-90; 9. *Staphylococcus xylosus*; 10. *Ureaplasma urealyticum*; 11. *Klebsiella aerogenes*; 12. *E. coli*; 13. *Proteus mirabilis*; 14. *Synechocystis* sp; 15. *Helicobacter pylori*; 16. *Haemophilus influenzae*; 17. *Yersinia pseudotuberculosis* e 18. *Yersinia enterocolitica* 76

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca do sistema radicular (MFSR) e porcentagem de colonização das raízes de plantas de fumo não-inoculadas ou inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> , 4 e 8 semanas após transplântio	47
Tabela 2. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone NtGi1 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	70
Tabela 3. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone NtGi2 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	71
Tabela 4. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone NtGi3 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	72
Tabela 5. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone NtGi1 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	73
Tabela 6. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone NtGi2 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	74
Tabela 7. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone NtGi3 com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados	75

Tabela 8. Sítios de regulação putativos presentes na sequência de aminoácidos deduzida para os clones NtGi2 e NtGi3	78
--	-----------

IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM MOLECULAR DE GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM RAÍZES DE FUMO (*Nicotiana tabacum*) INFECTADAS POR *Glomus intraradices*

Autora: RENATA FAVA DITT

Orientador: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

RESUMO

Com o objetivo de compreender os mecanismos que regulam a formação da simbiose entre fungos micorrízicos arbusculares e raízes de plantas, procurou-se identificar e clonar genes com expressão diferencial na interação através da técnica do “display” diferencial de cDNAs.

Raízes de fumo (*Nicotiana tabacum*) não-colonizadas e colonizadas pelo fungo *Glomus intraradices* foram coletadas, após um período experimental de oito semanas, para a extração de RNA. Em seguida, iniciadores com base na sequência poliadenílica do RNA mensageiro de eucariotos (oligo-dTs) foram utilizados para a síntese de cDNA. Iniciadores aleatórios ou combinações de iniciadores aleatórios e oligo-dTs foram utilizadas para amplificar, por PCR, a primeira fita de cDNA. Três produtos de amplificação presentes somente em amostras de raízes colonizadas foram identificados e clonados.

Os clones foram seqüenciados e suas seqüências comparadas às seqüências de genes conhecidos. O clone NtGi1 apresentou 55 a 70% e 33 a 66%

de identidade em nível de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, com genes que codificam proteínas acessórias da urease (UreG), de várias bactérias e *Arabidopsis*. O clone NtGi2 também apresentou alta homologia (55 a 66% em nível de nucleotídeos e 41 a 65% em nível de aminoácidos) com proteínas UreG de várias bactérias. Esse clone é praticamente idêntico à NtGi1, diferindo apenas por uma inserção de 74 nucleotídeos, entre as posições 534 e 607. A sequência de nucleotídeos do clone NtGi3 é idêntica à sequência de NtGi1, exceto pelo fato do clone NtGi1 abranger uma porção maior da região 3' do gene.

A análise da sequência de aminoácidos deduzida revelou a presença de sítios putativos de N-glicosilação (NYSR e NKTD), de ligação ATP/GTP (GPVGSGKT, “P-loop”) e de fosforilação por quinase-tirosina (RELADYIIY). Os sítios de glicosilação e de ligação ATP/GTP são conservados entre as proteínas UreG armazenadas nos bancos de dados. No entanto, o sítio de fosforilação é específico para os cDNAs isolados.

Com base nos resultados obtidos, é possível que as proteínas UreG estejam envolvidas no metabolismo do nitrogênio durante a simbiose ou ainda com a infectividade do fungo.

**IDENTIFICATION AND MOLECULAR CLONING OF GENES
DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum*)
ROOTS INFECTED BY *Glomus intraradices***

Author: RENATA FAVA DITT

Adviser: Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

SUMMARY

In order to understand the mechanisms that regulate the symbiosis between arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots, genes differentially expressed in the symbiosis were identified and cloned, using a cDNA differential display technique.

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) roots were either left noninoculated or were inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Roots were harvested eight weeks after inoculation and total RNA was extracted. Subsequently, oligo-dT based primers were used to generate single-stranded cDNA and then, a combination of two primers (random oligonucleotides and oligo-dT primers) or just a single random primer, were used to amplify the single-stranded cDNA by PCR. Three cDNAs present only among the amplification products from inoculated root samples were identified and cloned.

These cDNA clones were sequenced and compared to known sequences in the data banks. The clone NtGi1 showed 55 to 70% and 33 to 66% identity at the nucleotide and at the amino acid level, respectively, to urease accessory proteins (UreG) from bacteria and *Arabidopsis*. The clone NtGi2 also showed high identity (55 to 66% at the nucleotide level and 41 to 65% at the

amino acid level) to UreG proteins from many bacteria. This clone is nearly identical to NtGi1, differing only by an insertion of 74 nucleotides, between positions 534 and 607. NtGi3 is identical to NtGi1, except that NtGi1 contains an additional downstream sequence of the gene.

Analysis of the deduced amino acid sequences revealed putative sites for N-glycosylation (NYSR and NKTD), ATP/GTP binding (GPVGSGKT, P-loop) and tyrosine kinase phosphorylation (RELADYIIY). The putative N-glycosylation sites and ATP/GTP binding sites are conserved among other UreG proteins in the data banks. However, the presumed protein tyrosine kinase phosphorylation site is unique to the genes cloned from the *Nicotiana-Glomus intraradices* mycorrhizae.

Thus, based upon the results, it is possible that UreG proteins are involved in either nitrogen metabolism during this symbiosis or in fungal infectivity.

1. INTRODUÇÃO

Micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre as raízes da maioria das plantas terrestres e certos fungos de solo. O resultado desta interação mutualística geralmente se reflete através de um incremento na aquisição de determinados nutrientes por ambos os simbioss.

As micorrizas arbusculares (MAs) constituem-se na mais disseminada destas associações, ocorrendo em cerca de 80% das espécies de plantas. Caracterizam-se pela intensa colonização do tecido cortical das raízes, onde as hifas penetram inter- e intracelularmente, formando estruturas efêmeras, semelhantes a haustórios, denominadas arbúsculos. Os arbúsculos são responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbioss. A planta é favorecida principalmente pelo aumento na absorção de fósforo, enquanto o fungo se beneficia dos carboidratos sintetizados pela planta.

As MAs têm importância fundamental nos sistemas agrícolas tropicais, sendo uma alternativa viável para o desenvolvimento de uma agricultura auto-sustentável e de baixo custo. Essa importância se deve ao fato do fósforo ser um dos elementos mais limitantes para a produção vegetal em solos tropicais, além de ter uma mobilidade muito baixa na solução do solo. Adicionalmente, a adubação fosfatada é uma operação agrícola onerosa, e as reservas naturais de fosfato utilizadas na fabricação de fertilizantes fosfatados constituem-se em um recurso não-renovável.

Apesar da enorme importância, somente nos últimos anos o estudo da fisiologia das MAs tomou impulso, devido, principalmente, ao desenvolvimento

de técnicas bioquímicas e de biologia molecular. Ainda que este avanço tenha sido significativo, não se pode comparar com aquele obtido em outras interações planta-microrganismo, como a associação simbiótica entre leguminosas e bactérias do gênero (*Brady*)*Rhizobium* e as associações antagônicas entre plantas e patógenos, como, por exemplo, entre as dicotiledôneas e *Agrobacterium*. Diversos genes responsáveis pela regulação destas interações foram clonados e algumas vias de transmissão dos sinais bioquímicos que coordenam a expressão destes genes também já foram desvendadas.

A dificuldade em se progredir nos estudos de MAs deve-se principalmente ao fato de que o fungo possui natureza biotrófica, sendo incapaz de se desenvolver saprofiticamente, ou seja, na ausência da planta hospedeira. No entanto, para que as MAs, sejam utilizadas na sua potencialidade, levando à diminuição dos custos de produção agrícola, os mecanismos que regulam a simbiose devem ser desvendados. A maneira mais viável de se compreender estes mecanismos e de progredir definitivamente no estudo de MAs seria através do isolamento de genes preferencialmente modulados durante o desenvolvimento da simbiose. Entre os genes que participam na regulação da simbiose estariam aqueles responsáveis pelo crescimento saprofítico do fungo, pelo controle da colonização intraradicular, pela diferenciação dos arbúsculos, pela transferência de nutrientes, entre outros. Após o isolamento, estes genes poderiam ter seus níveis de expressão alterados para maximização da eficiência simbiótica.

Diversas evidências na literatura sugerem a existência de expressão gênica diferencial em MAs. As inúmeras modificações morfológicas e fisiológicas sofridas por ambos os simbiontes durante o desenvolvimento da interação devem ser resultantes de um complexo e refinado mecanismo de regulação gênica. Assim, é bastante provável que os produtos de genes vegetais ou fúngicos modulados durante a interação (induzidos ou suprimidos), tenham papel essencial na regulação desta simbiose.

O presente trabalho teve por objetivo a identificação e clonagem molecular de genes com expressão diferencial em raízes de fumo infectadas por *Glomus intraradices*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

Mais de 6.000 espécies de fungos do solo são capazes de formar micorrizas com cerca de 240.000 espécies de plantas. Tal interação simbiótica, presente em todos os ecossistemas naturais, representa um papel central no equilíbrio e na ciclagem de nutrientes do solo (Bonfante & Perotto, 1995).

Os principais tipos de interações micorrízicas encontrados na natureza são as ectomicorrizas e as endomicorrizas, este último compreendendo as ericóides, as orquidóides e as micorrizas arbusculares, ou MAs. As ectomicorrizas compreendem a associação estabelecida entre cerca de 450 espécies de plantas lenhosas, Angiospermas e Gimnospermas, tropicais e sub-tropicais, e mais de 5.000 espécies de fungos, pertencentes à classe dos Basidiomicetos, Ascomicetos e Zigomicetos (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). Caracteriza-se pela ausência de crescimento intracelular das hifas, diferentemente dos outros tipos de micorrizas. O crescimento extraradicular leva a alterações morfológicas nas hifas que se organizam em um tecido pseudoparenquimatoso, conhecido como manto. A profusa ramificação destas hifas por entre as células dos tecidos mais externos das raízes da planta hospedeira formam a rede de Hartig, cujo desenvolvimento parece estar sob o controle do hospedeiro, já que plantas não-hospedeiras não apresentam esta estrutura (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). As endomicorrizas do tipo ericóide desenvolvem-se entre fungos da classe dos Ascomicetos e somente alguns gêneros de plantas da família Ericaceae,

apresentando o maior grau de especificidade entre todos os tipos de associações micorrízicas. As micorrizas orquidóides desenvolvem-se entre plantas da família Orchidaceae e fungos Basidiomicetos (Gianinazzi-Pearson, 1996). Em ambas as interações, após a adesão das hifas do fungo à superfície da raiz, ocorre a penetração e o enovelamento das hifas no interior das células da epiderme radicular. A planta responde à infecção sintetizando compostos típicos da parede celular, que se depositam ao redor da hifa. Produz ainda uma membrana que envolve a hifa invasora, chamada membrana perisimbótica, que evita o contato direto entre o citoplasma vegetal e a célula fúngica, controlando assim a interação (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). As MAs desenvolvem-se entre a maioria das espécies de plantas conhecidas e aproximadamente 120 espécies de fungos pertencentes a ordem Glomales, classe dos Zigomicetos (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989; Koide & Schreiner, 1992). Caracterizam-se pela extensa colonização do córtex radicular e pela formação de arbúsculos, que seriam responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbioses (Bonfante & Perotto, 1995). A maioria das associações micorrízicas envolve um fluxo bidirecional de nutrientes entre os simbioses. A exceção são as micorrizas orquidóides, onde o fluxo é unidirecional, em favor da planta, envolvendo tanto carboidratos quanto nutrientes minerais (Smith et al., 1994).

2.2. Desenvolvimento de micorrizas arbusculares

As MAs ocorrem em mais de 80% de todas as espécies de plantas conhecidas, constituindo a simbiose mais frequentemente encontrada na natureza e a mais adequada para aplicações agrícolas que resultem em diminuição do custo da produção, já que ocorrem na maioria das plantas de interesse econômico. Como a origem destes fungos micorrízicos data de cerca de 300 a 400 milhões de anos atrás, sugere-se que esta interação tenha representado um importante papel

na conquista do ambiente terrestre pelas plantas (Bonfante & Perotto, 1995). Além disso, estes dados demonstram que a capacidade das plantas em desenvolver esta associação simbiótica é uma característica que deve estar sob o controle de mecanismos que foram conservados durante o desenvolvimento de novas espécies de plantas no processo de evolução, e que estes mecanismos estão amplamente disseminados no reino vegetal (Gianinazzi-Pearson, 1996).

O processo de colonização da planta pelo fungo micorrízico tem início através da germinação de um esporo ou crescimento de hifa, no solo ou em segmento de raiz infectada. Segue-se um crescimento profuso das hifas ao redor das raízes da planta hospedeira e possíveis mecanismos de reconhecimento levam à diferenciação do apressório sobre a superfície radicular. Em plantas hospedeiras, o apressório é, preferencialmente, formado entre duas células epidérmicas adjacentes, enquanto que em plantas não-hospedeiras ou em mutantes defectivos na capacidade de formar micorriza, estruturas semelhantes ao apressório são formadas, porém não se desenvolvem (Bonfante-Fasolo & Perotto, 1992; Bonfante & Perotto, 1995). Embora os sinais que induzem a sua formação sejam desconhecidos, sabe-se que não envolvem unicamente estímulos tigmotrópicos, ou seja, estímulos físicos resultantes da topografia da superfície radicular (Giovanetti et al., 1993), como acreditava-se anteriormente.

Nas camadas mais superficiais do córtex radicular, as hifas crescem por entre as células e podem formar enovelamentos intracelulares, podendo ou não desenvolver vesículas, estruturas de reserva. Por fim, alcançam as células mais internas do córtex, onde penetram intracelularmente. Hifas intracelulares terminais podem se diferenciar em arbúsculos, estruturas que caracterizam uma simbiose funcional (Figura 1). Os arbúsculos são estruturas efêmeras, permanecendo ativos por cerca de 5-6 dias, quando, então, colapsam e são degradados. São caracterizados por uma ramificação intensa das hifas, cujas paredes tornam-se extremamente finas. Esta é uma evidência que suporta a

Figura 1. Esquema do processo de colonização radicular por fungos micorrízicos-arbusculares.

hipótese destas estruturas serem responsáveis pela transferência bidirecional de nutrientes entre a planta e o fungo (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989; Bonfante-Fasolo & Perotto, 1992; Gianinazzi-Pearson, 1996).

Em contraste com as pequenas alterações morfológicas na camada de células mais superficiais do córtex, limitadas à deposição de material típico da parede celular ao redor da hifa invasora, as células contendo arbúsculos sofrem profundas alterações, tanto morfológicas quanto fisiológicas. Estas alterações incluem: aumento do volume citoplasmático; proliferação de organelas; intensa atividade de transcrição no núcleo, aumento do volume do núcleo, diminuição do tamanho do vacúolo; invaginação e síntese de membrana plasmática, dando origem à membrana perissimbiótica, a qual envolve as estruturas fúngicas e sintetiza ativamente material de parede celular (Bonfante & Perotto, 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996). Esta membrana apresenta as mesmas características morfológicas da membrana plasmática, embora seja caracterizada pela presença de fosfatases neutras e ATPases, atividades enzimáticas que não estão normalmente presentes na membrana vegetal (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989).

Além da membrana periarbuscular vegetal, a atividade de ATPases também pode ser encontrada nas membranas das hifas fúngicas intercelulares e nas hifas enoveladas intracelulares que se formam nas camadas mais superficiais do córtex da raiz. Por outro lado, a atividade de ATPases não é detectada nestas células superficiais do córtex radicular, assim como não é observada em células não-infectadas (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988; Bonfante & Perotto, 1995). Estes autores ressaltam que a formação da interface fungo-planta com elevada atividade enzimática é típica de micorrizas, devendo estar relacionada com a geração de energia para o intercâmbio de nutrientes, enquanto que em interações

parasíticas envolvendo haustório-célula hospedeira, a atividade é inexistente, uma vez que o transporte de nutrientes é unidirecional, em favor do parasita.

Sabe-se que apenas algumas famílias de plantas, pertencentes à duas ordens, Cariophyllales (Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae, Nyctaginaceae, Portulacaceae, Phytolaccaceae) e Capparales (Brassicaceae, Capparaceae, Resedaceae), além do gênero *Lupinus*, dentro da família Fabaceae, não são capazes de formar associações micorrízicas (Harley & Smith, 1983), embora os determinantes para tal incapacidade não sejam conhecidos. Koide & Schreiner (1992) sugerem duas hipóteses básicas para explicar a natureza não-micotrófica destas plantas: uma delas estaria relacionada à ausência, nestas plantas, de compostos-chave, responsáveis por enviar sinais químicos ao fungo micorrízico; o outro mecanismo envolveria a produção de compostos inibidores do desenvolvimento fúngico. Os autores não descartam a possibilidade de que algumas plantas possuam ambos os mecanismos. Sugerem ainda, a possibilidade de que estes mecanismos não tenham sido resultado de seleção direta contra os fungos micorrízicos, e sim, contra outros tipos de estresse, como por exemplo, a predação por insetos.

Em experimentos de enxertia realizados por Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi (1989), utilizando plantas de ervilha, normalmente micotrófica, como porta-enxerto, e plantas de *Lupinus albus*, não-micotrófica como enxerto, não foi observado nenhuma alteração nos processos iniciais de infecção, embora o desenvolvimento do micélio no interior dos tecidos radiculares tenha sido seriamente afetado e a formação de arbúsculos completamente inibida neste sistema. Essas observações sugerem a existência de um fator inibitório presente na parte aérea das plantas não-hospedeiras de *Lupinus albus*. Em plantas não-hospedeiras da família *Brassicaceae*, Schreiner & Koide (1993) demonstraram que compostos derivados de glicosinolatos, liberados pelas raízes, eram

responsáveis pela inibição da germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares.

A clonagem de genes regulados durante a simbiose e a determinação do papel dos produtos destes genes no desenvolvimento da interação seriam cruciais no sentido de estabelecer as verdadeiras razões pelas quais estas plantas são resistentes aos fungos micorrízicos. Estes conhecimentos poderiam ser aplicados no sentido de manipular a interação para que ela se torne viável também nestas plantas.

Uma das características mais marcantes dos fungos micorrízicos arbusculares, é a sua natureza biotrófica, sendo, portanto, incapaz de se desenvolver na ausência da planta hospedeira. Esta propriedade constitui-se em um dos principais fatores que impedem maiores avanços no estudo da fisiologia destes fungos e da associação micorrízica. Os esporos destes fungos são capazes de germinar em meios de cultura extremamente pobres, ou até mesmo em água, porém a manutenção do crescimento do fungo tem se apresentado recalcitrante, muito embora os mais diversos meios de cultura tenham sido investigados (Bonfante-Fasolo & Perotto, 1992). As razões para este fato são amplamente desconhecidas, porém, a hipótese de que os fungos micorrízicos arbusculares seriam incapazes de duplicar seu DNA na ausência da planta hospedeira, como acreditava-se anteriormente, foi inteiramente descartada, através de experimentos onde comprovou-se que o fungo *Gigaspora margarita* duplicava seu material genético durante a germinação do esporo (Bonfante & Perotto, 1995).

É bastante provável que fungos micorrízicos arbusculares tenha perdido a capacidade de se desenvolver isoladamente durante o processo de co-evolução com as plantas hospedeiras, e especula-se que, uma vez readquirida esta capacidade, o fungo poderia perder a habilidade de infectar as plantas (Hepper, 1984). Na verdade, o grau de interdependência é, muitas vezes, tão grande que algumas plantas altamente micotróficas são totalmente incapazes de se

desenvolver em solos extremamente pobres, na ausência do fungo, dependendo do mesmo para a sua sobrevivência.

A clonagem de genes modulados durante a simbiose e que estejam envolvidos na regulação do crescimento saprofítico do fungo poderiam contribuir para elucidar as causas da sua dependência da planta hospedeira e, assim, manipular estes fatores a fim de que se possa obter o crescimento fúngico *in vitro*. Este fato seria de extrema importância, não somente no sentido de permitir um maior progresso nas pesquisas envolvendo a fisiologia do fungo, como também no sentido de propiciar a produção de inoculantes para a utilização agrícola em larga escala.

O uso de um sistema de cultivo *in vitro* duplo, constituído pelo fungo micorrízico *Gigaspora margarita* e por raízes de cenoura transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*, tem permitido uma melhor compreensão da sequência de eventos iniciais do ciclo de vida do fungo (Becard & Piché, 1989). Na ausência das raízes de cenoura, o esporo do fungo germina e tem início o crescimento da hifa, que se processa por cerca de dez dias, alcançando um comprimento máximo de 30mm, quando por fim, o crescimento cessa. Com a presença das raízes no meio, mesmo após ter iniciado a germinação dos esporos, observa-se um crescimento das hifas até 20 vezes maior, sem a necessidade de que haja contato físico entre a planta e o fungo, sugerindo a existência de sinais químicos provenientes da raiz que se difundem no meio.

2.3. Biologia molecular de micorrizas arbusculares

2.3.1. Sinais moleculares

As interações entre plantas e microrganismos parecem ter início muito antes do estabelecimento do contato físico entre os organismos, através da troca

de sinais moleculares. Sejam quais forem estes sinais, devem ser compostos amplamente disseminados entre as plantas, pelo menos no que diz respeito às micorrizas arbusculares, uma vez que os fungos micorrízicos não possuem especificidade (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

O desenvolvimento das hifas fúngicas no sistema de co-cultivo *in vitro* com raízes de cenoura aponta para a existência de fatores solúveis, que, exsudados por uma planta hospedeira, são capazes de estimular o crescimento do fungo (Hepper, 1984), enquanto exsudatos de raízes não-hospedeiras não são capazes de causar o mesmo efeito (Bonfante-Fasolo & Perotto, 1992; Gianinazzi-Pearson, 1996). Na verdade, exsudatos de raízes não-hospedeiras parecem ter uma atividade inibitória sobre o processo de reconhecimento do hospedeiro pelo fungo e adesão da hifa, como demonstrou Giovannetti et al. (1993), utilizando plantas não-hospedeiras de *Lupinus albus* e o fungo *Glomus mosseae*.

Uma associação tão complexa quanto as micorrizas arbusculares deve envolver, não apenas um, mas diversos sinais, que seriam continuamente trocados entre os simbiossiontes durante o desenvolvimento da interação. Assim, sinais do hospedeiro presentes na rizosfera seriam responsáveis por dar início aos processos de germinação dos esporos e crescimento do tubo germinativo, sinais presentes na superfície da raiz estariam regulando a adesão e penetração, enquanto sinais atuantes no interior da raiz estariam envolvidos na formação dos arbúsculos, no controle do crescimento intraradicular do fungo e no transporte de nutrientes (Koide & Schreiner, 1992).

Com exceção do sistema de co-cultivo *in vitro*, a maioria dos experimentos conduzidos com a finalidade de verificar a influência de sinais físico-químicos do hospedeiro nos processos iniciais de reconhecimento, germinação do esporo, crescimento de hifas e formação do apressório, têm sido desenvolvidos em sistemas não-axênicos (Koide & Schreiner, 1992; Giovannetti et al., 1993). Este tipo de análise não permite discriminar entre os sinais

realmente produzidos pela planta hospedeira daqueles metabolizados por microrganismos associados à rizosfera. Com a finalidade de solucionar este problema e verificar a influência de fatores, como o estágio fisiológico do fungo e do hospedeiro no processo de reconhecimento, Giovannetti et al. (1996) desenvolveram um sistema de cultivo onde a raiz da planta é envolvida por duas membranas, e estas são colocadas em contato com uma outra membrana contendo esporos do fungo. Terminado o período experimental, a membrana contendo os esporos é removida e o crescimento das hifas em direção à planta hospedeira e a ramificação do micélio ao redor da raiz hospedeira são observados.

Os resultados deste experimento indicam que o reconhecimento ocorre mesmo em condições axênicas e que, portanto, os sinais seriam realmente derivados do hospedeiro. Utilizando-se membranas de porosidade crescente, foi possível determinar a massa molecular máxima destes sinais, por volta de 500 Da. Além disso, o reconhecimento entre os simbioses não foi alterado por variações no estágio fisiológico dos mesmos, assim como por variações na composição química e física das membranas.

Dentre os vários compostos que fazem parte dos exsudatos de raízes, os fenólicos têm sido apontados como possíveis sinais ativadores da transcrição gênica em micorrizas, já que constituem fatores importantes em outras interações planta-microrganismo (Peters & Verma, 1990). Nas associações entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero (*Brady*)*Rhizobium*, flavonóides exsudados por raízes e sementes, induzem a transcrição dos genes *nod*, cujos produtos são responsáveis, por sua vez, pela transcrição de genes vegetais que terão papel fundamental no estabelecimento desta simbiose (Dénarié et al., 1992). Também na interação entre dicotiledôneas e a bactéria patogênica *Agrobacterium tumefaciens*, os fenólicos exsudados através de ferimentos naturais possuem um papel fundamental na ativação dos genes *vir* bacterianos,

cujos produtos estão diretamente relacionados com o processo de infecção (Beijersbergen & Hooykaas, 1993).

Alguns relatos na literatura indicam que flavonóides também seriam importantes fatores envolvidos no desenvolvimento de MAs. A aplicação de determinados isoflavonóides, como formononetina e biocanina A, no solo, em concentrações tão baixas quanto 5mg.L^{-1} , foi capaz de estimular o crescimento de hifas de *Glomus* sp. e a colonização de plantas de trevo (Siqueira et al., 1991). Flavonóides também mostraram-se indutores do crescimento de hifas de *Gigaspora margarita* (Bécard et al., 1992). Os experimentos conduzidos em condições axênicas por Giovannetti et al. (1996), utilizando membranas de porosidade diferenciada para separar os dois simbiontes, não exclui a possibilidade de que os sinais do hospedeiro envolvidos na germinação dos esporos e no crescimento das hifas sejam flavonóides, já que a maioria deles possui peso molecular menor que 500 Da.

Apesar destas evidências, a importância dos flavonóides em interações micorrízicas ainda é uma questão polêmica. Recentemente, Bécard et al. (1995) provaram que estes compostos não são necessários para o estabelecimento da interação, pelo menos em relação às plantas utilizadas, milho e cenoura, e os fungos *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* e *Glomus etunicatum*. Plantas mutantes de petúnia, deficientes na síntese do flavonóide kampferol e, por isso, incapazes de induzir à germinação do pólen, não tiveram essa capacidade restaurada após a adição de extratos de raízes micorrizadas de cenoura, sugerindo a ausência do flavonóide nestes extratos. Além disso, plantas mutantes de milho, deficientes na produção de flavonóides, assim como a utilização de inibidores da síntese de flavonóides, não impediram o estabelecimento da interação. No entanto, é possível que outros fenólicos que não os flavonóides abordados neste estudo, tenham importância no desenvolvimento das micorrizas.

A comprovação do envolvimento de flavonóides nas interações micorrízicas tornar-se-ia possível após o isolamento dos genes modulados durante o desenvolvimento da simbiose. A indução dos promotores destes genes por compostos flavonóides, ou outros compostos quaisquer que venham a ter importância na sinalização entre os organismos, poderia ser, desta maneira, testada em condições controladas (Lambais, 1996).

É interessante notar que, além do papel sinalizador em interações leguminosas-rizóbio e dicotiledôneas-*Agrobacterium*, alguns fenólicos são induzidos na planta pelo contato com patógenos e, em altas concentrações, funcionam como importantes substâncias antimicrobianas, as denominadas fitoalexinas (Ebel, 1986).

O envolvimento de compostos fenólicos na regulação da simbiose parece não ser o único fator comum entre as associações micorrízicas e as interações leguminosas-rizóbio. Acredita-se que as plantas possuam mecanismos básicos únicos para o controle das duas simbioses, já que feijão e ervilha mutantes, incapazes de estabelecer uma associação simbiótica com rizóbio (fenótipo *nod*⁻), também não formavam micorriza arbuscular (fenótipo *myc*⁻) (Duc et al., 1989). O mesmo fenômeno foi observado por Bradbury et al. (1993), utilizando plantas de alfafa mutantes. O fenótipo *nod*⁻*fix*⁻ mostrou-se incapaz de estabelecer relação com rizóbio e fungos micorrízicos, enquanto o fenótipo *nod*⁻*fix*⁺, apesar de estabelecer uma interação inicial com rizóbio, formando nódulos, e um certo desenvolvimento de hifas de fungos micorrízicos, não era capaz de formar arbúsculos e os nódulos formados eram ineficientes (não fixavam nitrogênio).

Plantas com fenótipo *myc*⁻ podem ter a infecção bloqueada nas etapas iniciais ou quando o fungo inicia a formação do arbúsculo. Este bloqueio pode estar relacionado com a ativação do sistema de defesa vegetal. Desta maneira, os genes presentes nas plantas selvagens correspondentes aos genes mutados, devem

estar relacionados com a supressão do sistema de defesa vegetal, de tal maneira que o fungo possa se estabelecer (Gianinazzi-Pearson, 1996).

Sabe-se que altos níveis de nitrato inibem o estabelecimento da interação entre leguminosas e rizóbio, assim como altos teores de fósforo são inibitórios para o desenvolvimento de micorrizas (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 (*nod*⁻) e o segundo, por plantas supernodulantes, insensíveis à altos níveis de nitrato (*nts*). 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 ausente nas plantas *nts*. Os autores procuraram verificar se os mutantes *nts*, também seriam capazes de formar micorrizas em altos níveis de fósforo. Observaram que a micorrização nas plantas de soja *nts* foi inibida por altos teores de fósforo, indicando que o fator que controla a supressão da micorrização em altos níveis de fósforo não é o mesmo fator que controla a nodulação em altos níveis de nitrato.

Adicionalmente, Wyss et al. (1990b) detectaram, em raízes micorrizadas, proteínas semelhante às nodulinas (proteínas específicas de nódulos), através de anticorpos obtidos especificamente contra nodulinas. Mais recentemente, Fröhling et al. (1997) identificaram transcritos de uma das mais importantes nodulinas, a leghemoglobina, 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 fungo micorrízico, da mesma maneira 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).

Outra característica semelhante entre as duas interações é a ocorrência de uma membrana, sintetizada pela planta, que separa o citoplasma vegetal do microrganismo simbiote: a membrana peribacteróide na interação com rizóbio e a membrana periarbuscular, nas micorrizas. Na tentativa de verificar semelhanças entre proteínas relacionadas à infecção por rizóbio e à formação de micorriza, Perotto et al. (1993) utilizaram anticorpos altamente específicos para determinadas proteínas sintetizadas no cordão de infecção (estrutura formada pela bactéria na fase de penetração) e na membrana peribacteróide. Como anticorpos específicos para proteínas sintetizadas no cordão de infecção não reagiram com proteínas extraídas de micorrizas, os autores sugerem que os primeiros estágios do estabelecimento das simbioses seriam regulados por mecanismos diferenciados. Por outro lado, os anticorpos específicos para proteínas presentes na membrana peribacteróide reagiram fortemente com proteínas da membrana periarbuscular, sugerindo, mais uma vez, a existência de fatores comuns no controle das duas simbioses.

2.3.2. O sistema de defesa vegetal e o controle da simbiose

Apesar da intensa colonização radicular pelo fungo micorrízico-arbuscular, não observa-se resposta de defesa típica de interações planta-patógeno. Adicionalmente, a colonização limita-se ao tecido cortical, não sendo observada no cilindro vascular e tampouco no meristema radicular, indicando um desenvolvimento controlado (Gianinazzi-Pearson, 1996). Tem sido sugerido que os fungos micorrízicos arbusculares desenvolveram mecanismos altamente sofisticados de evitar ou suprimir as respostas de defesa, possibilitando que os mesmos se estabeleçam em um número tão grande de espécies de plantas,

formando a mais bem estabelecida e disseminada simbiose observada no reino vegetal (Gianinazzi-Pearson et al., 1996). A expressão diferencial de vários genes envolvidos na defesa vegetal contra o ataque de patógenos tem sido observada em micorrizas arbusculares e pode ter um papel fundamental no controle da colonização intraradicular (Lambais & Mehdy, 1995).

Entre os diversos mecanismos bioquímicos contra o ataque de microrganismos patogênicos à plantas podemos destacar:

1) Síntese de fitoalexinas, compostos com atividade antimicrobiana produzidos preferencialmente no sítio de infecção (Ebel, 1986). A via biosintética das fitoalexinas isoflavonóides (via dos fenilpropanóides) envolve a atuação de diversas enzimas, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI) e isoflavona redutase (IFR), as quais têm a sua atividade aumentada após a infecção por patógenos (Carr & Klessig, 1990);

2) Reforço da parede celular através da deposição de β -1,3-glucanas (calose), proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina ou GPRHs) e lignina, formando uma barreira contra o ingresso do patógeno (Lamb et al., 1989; Carr & Klessig, 1990);

3) Síntese de proteínas relacionadas à patogênese, ou proteínas-RP, que incluem enzimas com atividade de quitinases e β -1,3-glucanases. Quitinases e β -1,3-glucanases são induzidas tanto sistêmica- quanto localizadamente na planta após o contato com o patógeno e estão relacionadas à defesa já que são capazes de degradar polímeros de quitina e β -1,3-glucana presentes na parede celular da maioria dos fungos (Carr & Klessig, 1990).

As GPRHs foram localizadas na interface fungo-planta em micorrizas arbusculares pela primeira vez por Bonfante-Fasolo et al. (1991), utilizando-se de anticorpos específicos para estas proteínas. Os autores indicam que esta é uma confirmação estrutural da natureza simbiótica da interação: o espaço apoplástico

que separa os dois simbiossiontes não representa um impedimento à troca de substâncias entre os organismos, ao mesmo tempo que impede um contato direto entre as células, fato que poderia desencadear uma resposta de defesa vegetal, comprometendo a simbiose. O nível de transcritos (RNAm) que codificam as GPRHs foram detectados em maiores níveis em raízes micorrizadas, quando comparado com os controles não-micorrizados de plantas de salsa (Franken & Gnädinger, 1994), confirmando os dados de Bonfante-Fasolo et al. (1991).

Franken & Gnädinger (1994) investigaram a expressão de genes envolvidos na via biossintética dos fenilpropanóides em salsa e não observaram indução acima do nível normalmente encontrado em plantas não infectadas pelo fungo micorrízico. Altos níveis são observados claramente quando as plantas são infectadas por microrganismos patogênicos. Os autores observam que este fato não deve estar relacionado com a ausência de compostos elicitores no fungo micorrízico, uma vez que o mesmo é inteiramente capaz de elicitar respostas de defesa em plantas mutantes *myc*⁻. Portanto, mecanismos de supressão do sistema de defesa devem ocorrer nas interações micorrízicas compatíveis.

O nível de transcritos que codificam as enzimas envolvidas na síntese de flavonóides, como a FAL e CHS, aumentaram em raízes de alfafa micorrizadas, quando comparado com controles não-micorrizados (Harrison & Dixon, 1993), em oposição aos resultados obtidos por Franken & Gnädinger (1994), muito embora este aumento tenha sido apenas localizado.

Contrastando com estes resultados, Harrison & Dixon (1993) observaram que transcritos codificando a enzima IFR tiveram seus níveis diminuídos para quantidades inferiores às verificadas nos controles, sugerindo um mecanismo de supressão do sistema de defesa vegetal. No entanto, plantas de alfafa mutantes *myc*⁻ não estabeleceram uma interação eficiente com o fungo micorrízico e não apresentaram diminuição no nível de transcritos de IFR. A incapacidade dessas plantas mutantes em estabelecer uma interação com o fungo

micorrízico pode, portanto, estar relacionada com a ausência de um mecanismo de supressão do sistema de defesa vegetal (Harrison & Dixon, 1993).

Volpin et al. (1994) verificaram uma indução inicial, seguida de supressão das atividades de FAL e CHI em alfafa. Supressão do acúmulo de transcritos de CHI também foi observada por Lambais & Mehdy (1993) em raízes de feijoeiro micorrizadas.

Plantas de ervilha mutantes *myc*⁻, que tem a infecção bloqueada logo após a formação do apressório, também foram utilizadas por Gollotte et al. (1993) para verificar a ocorrência de reações de defesa. Foi observado o acúmulo de compostos fenólicos e de calose em células localizadas logo abaixo do apressório em plantas mutantes, mas não em plantas selvagens, sugerindo novamente um mecanismo de supressão do sistema de defesa vegetal em interações micorrízicas compatíveis.

Foi observado um aumento na atividade de enzimas do complexo celulolítico (que incluem endoglucanases e exoglucanases) em plantas micorrizadas, comparando-se com a atividade em plantas não-micorrizadas (Garcia-Garrido et al., 1992). Contudo, esta atividade foi bastante baixa, sugerindo que o fungo produz uma quantidade de enzima apenas suficiente para facilitar a sua penetração, sem comprometer a integridade do hospedeiro, evitando o desencadeamento de reações de defesa.

Indução inicial e transitória da atividade de endoquitinases e β -1,3-endoglucanases, seguida de posterior supressão, foi observada em raízes de feijão micorrizadas (Spanu et al., 1989; Lambais & Mehdy, 1993). A supressão da atividade de endoquitinases foi acompanhada por uma diminuição no nível de transcritos da enzima (Lambais & Mehdy, 1993). Os autores procuraram, ainda, relacionar teores de fósforo com alterações nas atividades enzimáticas e nos níveis dos transcritos. Em baixos teores de fósforo que, sabidamente, favorecem o estabelecimento da interação, a supressão foi mais evidente do que em altos níveis

de fósforo. A menor supressão do sistema de defesa vegetal em altos níveis de fósforo poderia explicar o limitado desenvolvimento da interação nesta situação, onde a presença do fungo não traria mais vantagens evidentes para a planta.

Blee & Anderson (1996) observaram, em plantas de feijão inoculadas por *Glomus intraradices*, acúmulo localizado de transcritos de FAL e quitinase em células contendo arbúsculos, embora o nível total de transcritos não tenha sido diferente daquele observado em plantas não inoculadas.

Acúmulo localizado de transcritos do sistema de defesa vegetal também foi observado por Lambais & Mehdy (1995). Transcritos de quitinase e β -1,3-glucanase acumularam-se predominantemente no cilindro vascular de plantas micorrizadas e de plantas não-micorrizadas, em alto e baixo nível de fósforo. No entanto, o nível destes RNAm foi sistemicamente suprimido em plantas micorrizadas. Foi observado ainda, o acúmulo localizado de RNAm codificando uma endoquitinase ácida e uma β -1,3-endoglucanase, ao redor e no interior de células contendo arbúsculos, em alto e baixo nível de fósforo, respectivamente (Lambais, 1993).

Gianinazzi-Pearson et al. (1990) compararam o padrão de expressão de uma proteína-RP, a PR-b₁, em raízes de fumo infectadas por *Glomus mosseae* ou pelo patógeno *Chalara elegans*, e verificaram que o acúmulo de transcritos de PR-b₁ em raízes micorrizadas era mais alto do que o acúmulo observado em controles não-micorrizados, porém mais baixo que o acúmulo observado em raízes infectadas pelo patógeno.

Sabe-se que diferentes espécies de fungos micorrízicos, assim como diferentes isolados da mesma espécie, apresentam taxas de colonização intraradicular diferenciadas em uma mesma espécie vegetal, embora as causas para este fato sejam desconhecidas. Lambais & Mehdy (1996) sugerem que essa colonização diferencial pode estar relacionada à supressão do sistema de defesa vegetal, já que isolados mais infectivos, que apresentam maiores taxas de

colonização intraradicular, foram capazes de induzir maior supressão de quitinases em plantas de soja, quando comparado com o nível de supressão em plantas colonizadas pelo isolado menos infectivo.

Desta maneira, a indução de respostas de defesa em interações micorrízicas compatíveis ocorre de maneira atenuada, transitória e/ou extremamente localizada, contrastando com o que se observa em interações planta-patógeno ou mesmo em interações micorrízicas incompatíveis.

Uma possível explicação para os mecanismos de supressão das defesas vegetais em micorrizas arbusculares seria a existência de uma molécula supressora. Entre os compostos vegetais que poderiam ser responsáveis por estes mecanismos de supressão, estão os fitohormônios, uma vez que os mesmos são capazes de regular a expressão de certos genes de defesa e têm sua concentração alterada durante o estabelecimento da simbiose (Lambais & Mehdy, 1993; Lambais & Mehdy, 1995). Uma outra possibilidade seria a indução de um supressor fúngico, uma vez que este tipo de molécula já foi identificada em certos microrganismos patogênicos. Este supressor seria induzido no fungo pelos produtos dos genes vegetais relacionados à simbiose (Lambais & Mehdy, 1993; Lambais & Mehdy, 1995).

Fatos conclusivos sobre a existência de uma molécula supressora do sistema de defesa vegetal assim como da influência dos hormônios vegetais na sua regulação, poderiam ser obtidos a partir da clonagem dos genes preferencialmente modulados durante o desenvolvimento da simbiose.

2.3.3. A transferência de nutrientes e a regulação da simbiose

O principal efeito observado em interações micorrízicas arbusculares é um incremento na absorção de fósforo pela planta hospedeira. Para esta, o benefício está associado à um custo em carbono reduzido que é utilizado pelo

fungo. Assim, é esperado que a simbiose possua mecanismos “auto-regulatórios”, onde o nível de infecção pode ser restringido conforme a disponibilidade de fósforo é aumentada, de maneira que o benefício líquido da simbiose seja mantido. Ao mesmo tempo, em condições onde a disponibilidade de fósforo é extremamente baixa, a interação também deve ser bloqueada, uma vez que plantas micorrizadas não apresentariam qualquer vantagem sobre plantas não-micorrizadas, e a interação poderia representar um dispêndio de fotossintetizados pela planta. Assim, os maiores níveis de colonização seriam observados em disponibilidades intermediárias de fósforo.

Partindo destes pressupostos, Koide & Li (1990) realizaram experimentos onde procuraram determinar parâmetros de colonização radicular em doses crescentes de fósforo, em plantas de girassol infectadas por *Glomus etunicatum*. Os autores observaram que os níveis de infecção aumentaram gradativamente, conforme a maior disponibilidade de fósforo, até chegar a um limite onde o aumento desta disponibilidade representava diminuição dos níveis de colonização, confirmando a hipótese. Assim, conclui-se que a infecção é limitada em qualquer situação onde a mesma não propiciar crescimento vegetal.

Embora os mecanismos envolvidos nesta “auto-regulação” não sejam conhecidos, são independentes do *status* nutricional da parte aérea (Koide & Li, 1990). Lambais & Mehdy (1995) sugerem uma hipótese para explicar o mecanismo de controle da simbiose, envolvendo o fósforo, fitohormônios e o sistema de defesa vegetal. Alterações no balanço hormonal causadas pela infecção do fungo, assim como por baixos níveis de fósforo (aumento de citocininas, diminuição de etileno) poderiam resultar na supressão do sistema de defesa vegetal, possibilitando o estabelecimento da interação. De maneira inversa, altos níveis de fósforo podem aumentar a síntese de etileno e, conseqüentemente, induzir a expressão de certas proteínas-RP (que sabidamente são induzidas por

etileno), além de outros mecanismos de defesa, impossibilitando o estabelecimento da simbiose.

Poucos estudos têm sido realizados com a finalidade de verificar alterações na expressão gênica durante o estabelecimento de micorrizas e esclarecer os mecanismos que regulam o desenvolvimento da simbiose e a transferência de nutrientes entre os simbiossiontes.

O primeiro relato descrevendo alterações da expressão gênica foi obtido em ectomicorrizas, comparando, em géis bidimensionais, o padrão protéico de amostras de raízes de eucalipto infectadas ou não por *Pisolithus tinctorius* (Hilbert & Martin, 1988). Foi observado um acúmulo de pelo menos 10 tipos diferentes de polipeptídeos ectomicorriza-específicos. Por semelhança com o termo “nodulina”, que se refere à proteínas específicas de nódulos de leguminosas, estes polipeptídeos foram denominados “ectomicorrizinas”. Guttenberger & Hampp (1992) sugerem que as alterações encontradas refletem apenas diferenças pré-existentes entre as plantas testadas e não verdadeiras ectomicorrizinas induzidas. Estes autores realizaram experimentos semelhantes e não puderam constatar nenhuma alteração significativa no padrão protéico. Contudo, estudos mais recentes, voltaram a confirmar a detecção de ectomicorrizinas, não apenas através de comparações do padrão protéico em géis bidimensionais (Burgess et al., 1995), como também por “screening” diferencial de cDNA, ou DNA complementar (Tagu et al., 1993).

Em MAs, o padrão protéico foi comparado pela primeira vez por Dumas et al. (1989), que verificaram um aumento no teor de proteínas solúveis em extratos de raízes micorrizadas, quando comparado com o teor em extratos provenientes de raízes não-micorrizadas. Novas proteínas, de origem vegetal e fúngica, foram detectadas e, embora não tenham sido determinadas a natureza e função destas proteínas, foram chamadas de “endomicorrizinas” por associação às ectomicorrizinas. Dois polipeptídeos de função desconhecida foram identificados

em géis bidimensionais contendo amostras de raízes de tomate micorrizadas, mas não foram identificados em amostras de raízes não-micorrizadas misturadas à hifas e vesículas fúngicas, indicando que os polipeptídeos são realmente induzidos pela micorrização (Simoneau et al., 1994).

Foi verificado aumento na atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (Gd) em raízes de pepino infectadas por fungos micorrízicos arbusculares, comparado com controles não-micorrizados (Rosendahl, 1992). Esta é a primeira enzima do ciclo pentose-fosfato, via alternativa para obtenção de energia pelas plantas, principalmente em condições de estresse. Além disso, esta via fornece precursores para a síntese de ácido nucléico, a qual é realmente aumentada durante o estabelecimento da interação (Bonfante & Perotto, 1995).

Aumento na atividade de fosfatases neutras e H^+ -ATPases também foi verificado em MAs (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). A alta atividade destas enzimas na interface fungo-planta deve estar envolvida no transporte de nutrientes entre os simbiontes (Smith & Smith, 1990).

Todos estes dados sugerem a existência de genes diferencialmente expressos durante a formação de MAs e, entre estes, poderiam estar os genes que coordenam a transferência de nutrientes entre os simbiontes. Os primeiros genes envolvidos no processo de transferência de nutrientes isolados em MAs codificam um transportador de açúcar (Harrison, 1996), um transportador de fosfato (Harrison & van Buuren, 1995) e uma ATPase (Murphy et al., 1997).

Sabe-se que as MAs são interações altamente exigentes em carboidratos e com a finalidade de estudar a expressão de genes que codificam transportadores de carboidratos, foi isolado, a partir de um banco de cDNA preparado de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *Glomus versiforme*, o gene que codifica um transportador de hexose (Harrison, 1996). Oligonucleotídeos foram elaborados com base em sequências altamente conservadas presentes em transportadores de açúcar isolados de outras espécies

de plantas. Estes oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar por PCR (“polymerase chain reaction” ou reação em cadeia da polimerase) o cDNA correspondente. Análise de “Southern blot” confirmou a origem vegetal do gene e análise de “northern blots” mostrou que o gene é preferencialmente induzido em raízes e, em menores níveis, nas folhas e no caule. O nível de transcritos aumentou duas a três vezes em raízes micorrizadas e este aumento foi observado igualmente em raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *Glomus intraradices*, assim como em raízes de *M. sativa* colonizadas por *G. versiforme*. Além dos transcritos terem sido localizados, por hibridização *in situ*, no floema e nos ápices radiculares de raízes não-micorrizadas, foram localizados também nas células do córtex amplamente colonizadas pelo fungo, confirmando seu papel no suprimento de altos níveis de carbono demandados por ambos os participantes da simbiose.

O gene codificando o transportador de fosfato também foi isolado de um banco de cDNA preparado de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *Glomus versiforme*. Utilizou-se como sonda, um fragmento do gene que codifica um transportador de fosfato de *Saccharomyces cerevisiae*. Através de “Southern blot” e posterior confirmação por PCR, determinou-se que se trata de um gene fúngico. Experimentos de hibridização *in situ* revelaram que a expressão deste gene se dá preferencialmente nas hifas extraradiculares, confirmando seu papel no processo de absorção do fósforo do solo (Harrison & van Buuren, 1995).

O gene codificando uma H^+ -ATPase foi isolado por “screening” diferencial, a partir de um banco de cDNA preparado de regiões do sistema radicular de *Hordeum vulgare* extensamente colonizadas por *Glomus intraradices* (Murphy et al., 1997). Foi confirmada a sua origem vegetal por análise de “Southern blot” e sua expressão diferencial por análise de “northern blots”.

A partir destas informações obtidas na literatura, observa-se um crescente interesse em isolar proteínas e/ou sequências gênicas que tenham uma

expressão diferencial (induzidos ou suprimidos) em micorrizas arbusculares, bem como genes simbiose-específicos.

2.4. Clonagem de genes diferencialmente expressos

Dentre os aproximadamente 100.000 genes presentes nos organismos superiores, cerca de apenas 15% são realmente expressos em uma única célula (Liang & Pardee, 1992). Todos os processos biológicos que ocorrerão nesta célula serão, em última análise, consequência da regulação gênica, que irá determinar quais genes serão expressos e quais permanecerão “silenciosos”. Daí a importância em se estudar a expressão gênica diferencial e em desenvolver metodologias que permitam detectá-la nos mais variados sistemas biológicos.

Neste sentido é que se insere a clonagem ou isolamento de genes, como ferramenta básica para que importantes mecanismos biológicos possam ser desvendados, e, desta maneira, controlados em aplicações biotecnológicas.

2.4.1. Hibridização diferencial e hibridização subtrativa

Normalmente, a identificação de genes induzidos ou suprimidos durante a diferenciação celular ou em resposta à estresses bióticos e abióticos é feita pelos métodos tradicionais de hibridização diferencial ou hibridização subtrativa. A hibridização diferencial, ou “screening” diferencial, requer a construção de dois bancos de cDNA para a síntese das sondas e identificação dos clones. Simplificadamente, RNA total ou RNA mensageiro (poliA) é extraído das células ou tecido onde o gene de interesse está sendo expresso e também das células ou tecido onde o gene não está sendo expresso. O RNA é utilizado como molde para a síntese de dois tipos de sondas de cDNA, as quais são hibridizadas separadamente com réplicas do mesmo banco de cDNA. Clones desse banco que

hibridizam com ambos os tipos de sondas, correspondem a genes que são expressos em ambos os tipos de células, enquanto clones que hibridizam com apenas uma das sondas representam genes diferencialmente expressos (Sambrook et al., 1989; Mantell et al., 1994). Além de trabalhoso, o método permite apenas a identificação de genes expressos em abundância no tecido de interesse (Sambrook et al., 1989). Apesar disto, a metodologia continua sendo empregada na clonagem de genes, como por exemplo, no recente trabalho de Murphy et al. (1997), onde o gene codificando uma H^+ -ATPase vegetal foi isolado, por “screening” diferencial de uma biblioteca de cDNA preparada de raízes de *Hordeum vulgare* colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus intraradices*. O método de hibridização subtrativa requer a síntese de um banco de cDNA e de sondas subtrativas para identificar ambos os tipos de clones: induzidos ou suprimidos. Simplificadamente, RNA total ou poliA é extraído das células ou tecido de interesse, sondas de cDNA são produzidas a partir deste RNA e, em seguida, são utilizadas para hibridizar com RNA total ou poliA extraído do tecido onde o gene de interesse não está sendo expresso. Genes expressos nas duas situações formarão híbridos RNA:DNA e poderão ser separados, por cromatografia, das fitas únicas de cDNA que não hibridizaram e que, portanto, representam genes expressos diferencialmente. Após dois ciclos de hibridização e cromatografia, obtém-se um enriquecimento das sondas de cDNA. Estas sondas subtrativas serão utilizadas para localizar o gene em um banco de cDNA. O método, embora extremamente trabalhoso, permite a identificação de genes expressos em menor abundância (Sambrook et al., 1989).

Tanto o processo de hibridização diferencial como a hibridização subtrativa demandam um tempo prolongado para a obtenção dos resultados e necessitam de grandes quantidades de RNA, nem sempre disponível em todos os tipos de tecidos e em determinadas condições experimentais. Além disso, a comparação dos modelos de expressão nas amostras não pode ser feita diretamente.

Quando se tem algum conhecimento do gene a ser isolado e/ou da proteína codificada por este gene, o trabalho de clonagem é simplificado consideravelmente. Quando se tem conhecimento sobre a proteína codificada pelo gene de interesse, anticorpos marcados, específicos para esta proteína, podem ser produzidos e utilizados para identificar o clone em um banco de expressão. Além disso, pode-se construir oligonucleotídeos degenerados, com base na sequência da proteína, e utilizá-los para a identificação de fragmentos do gene através de PCR. É possível ainda, utilizar fragmentos de genes isolados de outras espécies para identificar a existência de genes homólogos na espécie de interesse, através de hibridização. Utilizando esta última estratégia, Harrison & van Buuren (1995) isolaram um gene fúngico que codifica um transportador de fosfato, a partir de um banco de cDNA construído de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus versiforme*. Para localizar este gene no banco, foi utilizado como sonda o gene que codifica um transportador de fosfato de *Saccharomyces cerevisiae*. A síntese de oligonucleotídeos degenerados, com base em sequências conservadas de transportadores de açúcar de várias espécies, foi utilizada por Harrison (1996) para amplificar, por PCR, o gene correspondente em um banco de cDNA preparado de raízes de *Medicago truncatula* colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus versiforme*. Embora bastante interessante, as estratégias descritas nestes dois trabalhos somente podem ser utilizadas quando se deseja identificar um gene específico, com características conhecidas, e não podem ser aplicadas quando se quer identificar novos genes, sobre os quais não se tem qualquer conhecimento.

2.4.2. “Display” diferencial

O “display” diferencial (DD) é uma técnica desenvolvida por Liang & Pardee (1992), com o intuito de simplificar consideravelmente o processo de

clonagem de genes diferencialmente expressos, sobre os quais não se tenha qualquer informação. Consiste, primeiramente, na transcrição reversa de RNA mensageiro (RNAm) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores que se pareiam à sequência poliadenílica (poliA) presente na extremidade 3' do RNAm de eucariotos. Além de um número determinado de tiaminas (T) na extremidade 5', geralmente 11, 12 ou 13, as quais irão parear com o poliA, estes iniciadores apresentam uma ou duas bases específicas na extremidade 3'. Utilizando-se duas bases ancoradas na extremidade 3', excetuando-se tiamina como penúltima base, existem doze diferentes combinações possíveis de serem formadas. Assim, cada um destes iniciadores irá reconhecer 1/12 da população de RNAm e iniciar a transcrição reversa somente desta subpopulação (Liang & Pardee, 1992).

Após o surgimento da técnica, a mesma foi incrementada com base na observação de que a penúltima base poderia ser degenerada. Desta maneira, quatro diferentes tipos de iniciadores seriam possíveis, cada um deles reconhecendo 1/4 da população de RNAs mensageiros (Liang et al., 1993; Liang et al., 1994).

A primeira fita de cDNA sintetizada através da transcrição reversa é, em seguida, amplificada por PCR na presença de dois oligonucleotídeos iniciadores: o mesmo iniciador ancorado ao poliA usado na etapa de transcrição reversa e um iniciador de sequência arbitrária, geralmente um decanucleotídeo. Através de cálculos matemáticos, Bauer et al. (1993) demonstraram que seriam necessários cerca de 20 decanucleotídeos aleatórios, em combinação com os iniciadores ancorados, para que todos os RNAs mensageiros transcritos em uma determinada situação pudessem ser detectados pelo DD.

Durante a etapa de amplificação, normalmente utilizam-se nucleotídeos marcados com radioisótopos e os cDNAs amplificados são separados por eletroforese em gel de sequenciamento. O padrão de bandejamento é analisado por autoradiografia do gel. Uma das grandes vantagens do método

consiste na comparação direta das populações de cDNA nas diferentes amostras, através da inspeção visual dos autoradiogramas. Após a identificação das bandas diferenciais, o cDNA correspondente é eluído do gel, reamplificado e utilizado como sonda em “northern blots” para confirmação da expressão diferencial. Em seguida, o cDNA é sequenciado para atribuição de função, podendo ser utilizado como sonda para o isolamento do gene completo em um banco de DNA genômico.

Outra vantagem do DD em relação aos métodos clássicos de isolamento de genes baseia-se no fato de que, sendo uma técnica que utiliza PCR, seria possível detectar genes expressos com baixa abundância, teoricamente, até mesmo genes com uma única cópia de RNAm por célula. Contudo, Bertoli et al. (1995), após análise profunda da técnica, indicaram que o DD apresenta elevada tendência à detecção de cDNAs presentes em grande número de cópias. Este problema poderia ser parcialmente resolvido com a utilização de iniciadores de maior número de bases e que, portanto, apresentam maior especificidade. Outro problema inerente ao DD é a detecção de “falsos positivos”, ou seja, cDNAs com aparente expressão diferencial no gel, mas que não tem este padrão confirmado em análises de “northern blot”. Adicionalmente, a baixa reproducibilidade das reações de amplificação também pode se constituir em uma dificuldade. Uma das maneiras de resolver estes problemas seria através da realização de reações réplicas de PCR e também através da utilização de iniciadores mais longos e temperaturas de pareamento maiores, aumentando portanto, a especificidade (Zhao et al., 1995).

Apesar destes problemas e de ser uma técnica recente, diversos trabalhos têm sido publicados utilizando-se o DD para a clonagem de genes com expressão diferencial. Entre eles, destacam-se aqueles relacionados aos estudos do câncer (Liang et al., 1992; Sager et al., 1993). Em plantas, a aplicação do DD é mais recente. Genes relacionados ao amadurecimento de frutos de tomate (Oh et

al., 1995) e morango (Wilkinson et al., 1995), assim como genes relacionados ao estresse causado por ozônio em *Arabidopsis* (Sharma & Davis, 1995) foram identificados.

Recentemente, a técnica do DD foi utilizada para a clonagem de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de MAs (Delp et al., 1996; Vögeli-Lange et al., 1996a). Algumas das sequências gênicas isoladas apresentaram homologia com sequências já conhecidas, porém, a comprovação desta homologia aguarda uma caracterização final.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção de raízes de fumo

3.1.1. Implantação do experimento

Sementes de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) foram semeadas em caixas de isopor contendo uma mistura esterilizada de areia e vermiculita (2:1), sendo mantidas em casa-de-vegetação e irrigadas alternadamente com água destilada ou solução de Hoagland (Sarruge, 1975). Mudas com 40 dias de idade, de mesmo tamanho e mesmo estágio de desenvolvimento (5 folhas), foram transplantadas para vasos contendo 3kg de uma mistura de areia e vermiculita (2:1) esterilizada, sendo cultivadas sob condições de casa-de-vegetação.

A inoculação com o fungo micorrízico *Glomus intraradices* isolado 26 foi realizada no momento do transplântio. O inóculo (aproximadamente 10ml) constou de uma mistura de solo, esporos fúngicos e fragmentos de hifas e raízes de *Brachiaria* com 80% de colonização. Após a inoculação as plantas receberam adubação básica contendo: 60mg de P, 240mg de N (em duas aplicações de 120mg, separadas de 15 dias), 300mg de K, 120mg de Ca, 60mg de Mg, 1ml de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1ml de solução de micronutrientes de Hoagland, por vaso. O delineamento experimental foi totalmente casualizado com dois tratamentos (Ni = não-inoculado e Gi = inoculado com *Glomus intraradices*) e vinte repetições.

3.1.2. Coleta das amostras e determinação da colonização radicular

Dez repetições de cada tratamento foram colhidas 4 semanas após o transplântio. As demais repetições foram colhidas 8 semanas após o transplântio. Durante a colheita, a parte aérea foi separada da raiz e seca em estufa à 60⁰C, até massa constante, para determinação da massa de matéria seca. As raízes foram lavadas em água corrente, o excesso de umidade foi removido com papel absorvente, e, após a obtenção do peso fresco, foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80⁰C.

Antes de congelar as amostras, cerca de 0,5g de raízes foram separadas e armazenadas em tubos de ensaio contendo AFA (ácido acético glacial 2%, formaldeído 2%, álcool etílico 45%) para posterior determinação do nível de colonização. Estas amostras de raízes foram lavadas em água e aquecidas à 90⁰C em KOH 10%, por 50 min. Após nova lavagem em água, foram lavadas em HCl 5%, por 5 min. Em seguida, foram coradas com azul de tripano em lactoglicerol, à 90⁰C, por 4 min., e mantidas em lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970). A determinação da porcentagem de colonização foi feita por contagem de fragmentos de raízes infectados sob microscópio estereoscópico (Giovanetti & Mosse, 1980).

3.2. Extração de RNA total e RNA mensageiro

O procedimento para a extração de RNA total é descrito em Lambais & Mehdy (1993). Todas as soluções foram preparadas em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e a vidraria foi esterilizada à 120⁰C, para eliminação de RNAses (Sambrook et al., 1989).

Um total de 5g de raízes (resultante da mistura de cerca de 0,5g de cada uma das dez repetições) foi macerado em nitrogênio líquido e

homogeneizado em tampão TLE (tris-HCl 200mM, cloreto de lítio 100mM, EDTA 5mM, pH 8,3) e fenol saturado em TLE. Os ácidos nucleicos foram extraídos duas vezes com fenol saturado em TLE, uma vez em uma mistura de fenol saturado em TLE e cloróformio (1:1, vol/vol), e uma vez em cloróformio. O RNA foi precipitado em etanol 100% e resuspendido em água tratada com DEPC. Os polissacarídeos foram removidos através de precipitação em acetato de sódio 3M e centrifugação (11.953g, 15 min.) em NaCl 300mM. O RNA contido no sobrenadante foi precipitado em etanol 100% e dissolvido em água tratada com DEPC.

A extração de RNA mensageiro, a partir de 600µg de RNA total, foi realizada em colunas de oligo(dT)-celulose, conforme instruções do fabricante ("mRNA Purification Kit", Pharmacia), exceto pelo fato de que as lavagens e a eluição do RNAm foram realizadas por gravidade.

A concentração de RNA total e RNA mensageiro foi determinada por espectrofotometria, considerando-se cada $OD_{260} = 40\mu\text{g de RNA.ml}^{-1}$ (Sambrook et al., 1989). A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose-formaldeído (Sambrook et al., 1989).

3.3. Síntese de cDNA

A fim de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, as amostras de RNA foram submetidas à tratamento com DNase, antes de se proceder a reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA. O tratamento foi realizado em misturas de reações de 50µl contendo 50µg de RNA total, 40U de inibidor de RNase (Stratagene), 10U de DNase I livre de RNase (Boehringer Mannheim), tris-HCl 10mM (pH 8.3), KCl 50mM, $MgCl_2$ 1,5mM. Incubou-se as misturas de reações por 1 h a 37°C.

O RNA tratado foi extraído uma vez com fenol:clorofórmio (3:1, vol/vol) e precipitado na presença de acetato de sódio 300mM e 3 volumes de etanol 100% a -80°C por 1 h. Centrifugou-se a 4°C , velocidade máxima em microcentrífuga (Microcentaur, Sanyo), por 10 min., o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado em etanol 70% (diluído em água-DEPC). O RNA foi solubilizado em 20 μl de água-DEPC e quantificado por espectrofotometria.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizadas 2 μg de RNA total tratado com DNase. À cada amostra de RNA foi adicionado iniciador ancorado 0,6 μM e água (tratada com DEPC) até completar 40 μl . Os iniciadores utilizados foram: AP1 = 5'T₁₃VC3' ou AP2 = 5'T₁₃VG3', onde V = C, G ou A. A mistura foi aquecida a 65°C , por 5 min. e resfriada lentamente, até temperatura ambiente. Foram então adicionados: solução tampão para síntese da primeira fita 1X, 40U de inibidor de RNase (Stratagene), dNTPs (dinucleotídeos) 4mM cada e 20U de transcriptase reversa M-MuLV (Stratagene). As misturas das reações foram incubadas a 37°C , por 1 h, aquecidas a 95°C por 5 min. e estocadas a -20°C .

3.4. Amplificação do cDNA por PCR

3.4.1. Método 1: utilizando-se dois iniciadores

Uma alíquota de 2 μl da reação de transcrição reversa foi utilizada em misturas de reações de 20 μl contendo o mesmo iniciador ancorado utilizado na etapa anterior, AP1 ou AP2 0,2 μM , iniciador aleatório RP1 (5'TACAACGA GC3') 0,2 μM , solução tampão para PCR 1X, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 2 μM cada e 1U de DNA polimerase Taq (Gibco BRL). Os tubos foram colocados em termociclador programado para 40 ciclos de 30 s. à 94°C , 2 min. à 40°C e 30 s. à 72°C . A estes 40 ciclos seguiu-se um período de extensão de 5 min. à 72°C .

3.4.2. Método 2: utilizando-se um iniciador

Uma alíquota de 1µl da reação de transcrição reversa foi utilizada em misturas de reações de 25µl, contendo iniciador aleatório B03 (5'ACTTCGACA A3') ou B07 (5'AGATGCAGCC3') 0,2µM, solução tampão para PCR 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 100µM cada e 0,5U de DNA polimerase Taq (Gibco BRL). A amplificação foi feita em 45 ciclos de 1 min. à 94⁰C, 1 min. à 42⁰C e 2 min. à 72⁰C, seguidos de um período de extensão de 5 min. à 72⁰C.

3.5. Análise dos produtos da PCR

3.5.1. Em gel de poliacrilamida

Uma alíquota de 5µl da reação de amplificação (Método 1) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, 1mm de espessura, 16 X 20cm, em tampão TBE 1X (tris 800mM, ácido bórico 800mM, EDTA 20mM), à 200V constante por 4 h. O gel foi corado com prata de acordo com Sanguinetti et al. (1994): o gel foi imerso em solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 0,5%) por 3 min. Em seguida foi corado na mesma solução fixadora acrescida de nitrato de prata 0,2%, por 5 min. Procedeu-se uma lavagem de 20 s. e outra de 1 min., em água destilada desionizada. O gel foi tratado em solução reveladora (NaOH 3% e formaldeído 0,5% de uma solução comercial 37%) até o aparecimento das bandas (aproximadamente 5 min.). A reação foi paralisada com solução fixadora por 5 min. e o gel foi lavado em água destilada desionizada por 10 min. A prata das soluções foi removida por precipitação com HCl, evitando-se o risco de contaminação do ambiente. Foram utilizados 1ml de uma solução 1+1 de HCl em água, para cada litro de solução de nitrato de prata 0,2%.

3.5.2. Em gel de agarose

Uma alíquota de 10µl da reação de amplificação (Método 2) foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2%, em TBE 0,5X, à 70V por 2 h. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml) e fotografado sob luz ultravioleta.

3.6. Isolamento dos cDNAs diferenciais

3.6.1. De gel de poliacrilamida

As bandas diferenciais identificadas por inspeção visual no gel de poliacrilamida foram removidas do gel (úmido ou seco à temperatura ambiente) com um bisturi limpo e colocadas em tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 100µl de água destilada desionizada, sendo os tubos mantidos à 4°C por 12 h e aquecidos à 95°C por 30 min. Uma alíquota de 8µl foi utilizada para reamplificação, de acordo com o Método 1, descrito no item 3.4.1.

3.6.2. De gel de agarose

As bandas diferenciais identificadas no gel de agarose foram removidas e purificadas por eletroeluição em membranas de diálise. As membranas de diálise foram preparadas de acordo com Sambrook et al. (1989). Os fragmentos de agarose foram colocados nas membranas, fechadas em uma das extremidades por um prendedor. Em seguida, adicionou-se 500µl de TBE 0,5X e fechou-se a outra extremidade com prendedor. A eluição do DNA foi feita em cuba de eletroforese contendo TBE 0,5X, a 70V por 1 h. Em seguida, a corrente

foi revertida por cerca de 5 min., de maneira a permitir que o DNA que estivesse aderido a membrana entrasse em solução. O DNA foi purificado com fenol:clorofórmio (3:1, vol/vol) e 2 volumes de etanol 100%, contendo acetato de sódio 300mM. O precipitado foi lavado em etanol 70% e solubilizado em 25µl de água destilada desionizada.

3.7. Confirmação da expressão diferencial por “dot blot”

Os cDNAs diferenciais isolados de gel de agarose foram marcados com digoxigenina-11-dUTP (DIG-11-dUTP, Boehringer Mannheim) em reações de PCR, realizadas como descrito anteriormente (Método 2, item 3.4.2.), exceto pelo acréscimo de DIG-11-dUTP 10µM, para utilização como sonda.

O produto total da amplificação do cDNA foi desnaturado a 96°C, por 5 min., resfriado em gelo e transferido sob vácuo, em SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M pH 7,0) 10X, para membranas Hybond (Amersham) pré-equilibradas em SSC 10X. As membranas foram incubadas em solução de desnaturação (NaOH 0,5M, NaCl 1,5M), durante 5 min., e em solução de neutralização (tris-HCl 0,2M pH 7,5, NaCl 1,5M), durante 2 min. O DNA foi fixado a 120°C por 20 min. A seguir, as membranas foram pré-hibridizadas em solução contendo: sarcosil 0,1%, SDS (sódio-dodecil sulfato) 0,01%, bloqueador (leite em pó desnatado) 2%, SSC 5X, (300µl.cm⁻² de membrana) a 65°C por 4 h. As sondas de cDNA foram desnaturadas a 96°C por 10 min. e resfriadas em gelo. A hibridização foi feita em solução de pré-hibridização, (5µl.cm⁻²), contendo 50ng da sonda desnaturada, a 65°C por 13 h. As membranas foram lavadas duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1%, a 65°C durante 10 min. e duas vezes em SSC 0,5X, SDS 0,1%, a 65°C durante 15 min.

Para a detecção das sequências hibridizadas, as membranas foram lavadas ($20\mu\text{l.cm}^{-2}$) em tampão 1 (ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M pH7,5) durante 5 min. e, em seguida, bloqueadas em tampão 2 (tampão 1, com Molico 2%) por 60 min., conforme instruções do fabricante (Boehringer Mannheim). O anticorpo anti-DIG foi diluído em tampão 2 ($1\mu\text{l}/10\text{ml}$), incubando-se as membranas por 30 min. As lavagens para retirada do anticorpo livre foram feitas em tampão 1 com SDS 0,1% (1ml.cm^{-2}), por 15 min., duas vezes, e em tampão 1, por 15 min., duas vezes. As membranas foram equilibradas por 5 min. em tampão 3 (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM e MgCl_2 50mM) e incubadas por 5 min. em tampão 3 contendo o substrato diluído (Lumigen-PPD 1:200 em tampão 3). Em seguida as membranas foram envolvidas com filme plástico, incubadas à 37°C por 5 min. e expostas à filme de raio-X (Hyperfilm-ECL, Amersham) por 20 min. Após esse período, o filme foi revelado, conforme instruções do fabricante (Kodak).

3.8. Clonagem dos cDNAs

Os fragmentos de cDNA isolados foram ligados ao vetor pCR-Script SK(+), conforme instruções do fabricante (“pCR-Script SK(+) Cloning Kit”, Stratagene). A reação de ligação dos fragmentos de cDNA ao fago vetor foi efetuada da seguinte forma: em cada tubo de microcentrífuga foi adicionado 10ng de vetor, 200ng de cDNA, tampão de ligação 1X, rATP 0,5mM, 5U da enzima *SrfI* e 4U de DNA ligase T4, totalizando $10\mu\text{l}$. A reação foi conduzida a 25°C por 2,5 h e, após esse período, as enzimas foram inativadas a 65°C por 10 min.

Em seguida, $4\mu\text{l}$ da reação de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH-5 α . À $200\mu\text{l}$ de células foi adicionado β -mercaptoetanol para uma concentração final de 25mM. As células

foram mantidas no gelo por 10 min. e os 4µl da reação de ligação foram adicionados à mistura, mantida no gelo por mais 20 min. Em seguida, procedeu-se choque térmico à 42°C por 2 min. Foi adicionado 500µl de meio LB (Luria Bertani, Sambrook et al., 1989) líquido, incubando-se à 37°C por cerca de 1 h.

Foram plaqueados 50, 100 e 150µl da suspensão de células transformadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50µg.ml⁻¹), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside, 20µl/placa, de uma solução estoque 10%, em dimetilformamida) e IPTG (isopropiltio-β-D-galactoside, 20µl/placa, de uma solução estoque 200mM, em água). As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 15 h, sendo as colônias brancas identificadas e coletadas com palitos estéreis para serem multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina.

Esta cultura foi utilizada para extração rápida de DNA plasmidial e digestão por endonucleases de restrição, a fim de se verificar a presença do inserto. A minipreparação de DNA foi realizada da seguinte maneira: 1ml da cultura foi centrifugado em tubo de microcentrífuga (Microcentaur, Sanyo) para obter o precipitado bacteriano. O meio foi descartado e o precipitado resuspendido em 300µl de TENS (tris 10mM pH 7,5; EDTA 1mM; NaOH 0,1N; SDS 0,5%) agitando-se vigorosamente. Em seguida, adicionou-se 150µl de acetato de sódio 3M, misturou-se e centrifugou-se 5 min. a velocidade máxima, em microcentrífuga (Microcentaur, Sanyo). O sobrenadante foi transferido para tubo novo e o DNA foi precipitado com 800µl de etanol 100%. Centrifugou-se 8 min. a velocidade máxima em microcentrífuga e lavou-se o precipitado com etanol 70%. O precipitado seco foi resuspendido em 20µl de água destilada desionizada e tratado com RNase A (10µg.ml⁻¹). Esta preparação foi digerida por 1,5 h a 37°C, com as enzimas *SstI* e *HindIII*, cujos sítios de restrição flanqueiam os insertos. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, TBE 0,5X.

3.9. Sequenciamento dos cDNAs e análise das sequências

Com a finalidade de preparar DNA dos clones para sequenciamento, foi utilizado 50ml de uma cultura de *E. coli* em meio LB líquido contendo antibiótico ($75\mu\text{g.ml}^{-1}$), incubada a 37°C , com agitação. Após 24 h, a cultura foi transferida para tubo de 50ml e centrifugada a 5.000g , 4°C , por 15 min. Descartou-se o meio e resuspendeu-se o precipitado em 6ml de solução 1 gelada (glicose 50mM, tris-Cl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0, autoclavada), agitando-se vigorosamente. Adicionou-se 12ml de solução 2 preparada na hora (NaOH 0,2N, SDS 1%), misturou-se invertendo o tubo e manteve-se 10 min. no gelo. Adicionou-se 9ml de solução 3 (acetato de potássio 3M, ácido acético glacial 10%), misturou-se invertendo o tubo e manteve-se no gelo por 20 min. Centrifugou-se a 33.000g , 4°C , por 15 min. e transferiu-se o sobrenadante para tubos novos. Foi adicionado RNase A ($2\mu\text{g.ml}^{-1}$) e incubado a 37°C , por 20 min. O DNA foi extraído duas vezes com fenol:clorofórmio (1:1, vol/vol) e precipitado em 2 volumes de etanol 100% gelado, por 12 h a -20°C . Centrifugou-se a 15.000g , 4°C , por 20 min. e o precipitado foi lavado em etanol 70% gelado. Após seco, o precipitado foi resuspendido em $300\mu\text{l}$ de água destilada desionizada.

Uma quantidade de 500ng de cada clone foi utilizada para o sequenciamento, na Universidade do Texas, Austin-EUA, pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977), utilizando-se o iniciador T3.

A análise das sequências obtidas para determinação de homologia com outras sequências armazenadas em banco de dados foi feita através do BLAST - NCBI ("Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information"), pela Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A dedução, análise e alinhamento das sequências de aminoácidos com sequências conhecidas foi feita através do MAP - BCM ("Multiple Sequence Alignment - Baylor College of Medicine"), pela Internet (<http://kiwi.imgen.bcm.tcm.edu:8088/search-launcher/launcher.html>).

3.10. Confirmação da expressão diferencial

3.10.1. Análise de "northern blot" com sonda radiativa

Na tentativa de confirmar a expressão diferencial obtida no gel e no experimento de "dot blot", foram realizadas hibridizações com "northern blots" de sonda radiativa e de sonda marcada com DIG-11-dUTP.

A análise de "northern blot" com sonda radiativa foi realizada da seguinte maneira: 20µg de RNA total de raízes micorrizadas e não-micorrizadas, 4 e 8 semanas após a inoculação (Ni4, Gi4, Ni8, Gi8, respectivamente) e 10µg de poliA, 8 semanas após a inoculação (Ni8, Gi8) foram separados por eletroforese em gel de agarose-formaldeído. O gel foi lavado por 30 min. em água destilada desionizada, para remover o excesso de formaldeído e de brometo de etídeo, e equilibrado por 5 min. em SSC 10X. O RNA foi transferido por capilaridade para membranas Hybond (Amersham) em SSC 10X, por 12 h, e fixado por "crosslinker" com luz U.V. (120.000µJ em Stratalinker, Stratagene).

As membranas foram pré-hibridizadas por 8 h, a 50°C, em SSPE 5X (cloreto de sódio 750mM, fosfato de sódio 57,5mM, EDTA 5mM pH 7,4), solução de Denhardt 5X (estoque 50X: 5g de ficoll, 5g de polivinilpirrolidona e 5g de albumina bovina (BSA), completando para 500ml de água), SDS 0,5% e DNA de esperma de salmão (100µg/ml) desnaturado. A hibridização foi feita na

mesma solução, acrescentando-se a sonda de cDNA marcada e desnaturada, por 12 h a 50°C.

A marcação das sondas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP foi feita de acordo com instruções do fabricante (“Random primed DNA labeling kit”, Boehringer-Mannheim) e os nucleotídeos não-incorporados foram removidos em “Bio-spin column 30” (Bio-Rad).

Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em SSPE 2X, SDS 0,1%, por 10 min. a temperatura ambiente, uma vez em SSPE 1X, SDS 0,1%, por 15 min. à 50°C e uma vez em SSPE 0,1X, SDS 0,1% por 15 min., a 50°C. Finalmente, as membranas foram expostas à filme de raio-X (Kodak) por 15 dias.

3.10.2. Análise de “northern blot” com sonda marcada com DIG-dUTP

Foi transferido e fixado em membranas Hybond (Amersham) 30µg de RNA total de raízes micorrizadas e não-micorrizadas, 8 semanas após a inoculação (Ni8 e Gi8, respectivamente). Os procedimentos foram realizados como descrito no item anterior (3.10.1). As membranas foram pré-hibridizadas por 4 h, à 50°C, em formamida 50%, SSC 5X, fosfato de sódio 50mM (pH 7.2), bloqueador (leite em pó desnatado) 2%, SDS 7% e laurilsarcosil 0,1%. A hibridização foi feita na mesma solução, acrescentando-se a sonda desnaturada, por 12 h, à 50°C.

As sondas foram marcadas por PCR, em reações de 30µl, contendo: 20ng de DNA plasmidial, tampão para PCR 1X, MgCl_2 4mM, dNTPs 300µM, DIG-11-dUTP 30µM, iniciadores T3 e T7 1µM e 1U de DNA polimerase Taq (Gibco BRL). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 3 min. à 94°C; 29 ciclos de 1 min. à 94°C, 1 min. à 55°C e 3 min. à 72°C; 1 ciclo de 10 min. à 72°C.

As lavagens foram feitas duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1%, por 5 min. à temperatura ambiente e duas vezes em SSC 0,5X, SDS 0,1%, por 15 min. à 65⁰C. A detecção das sequências hibridizadas foi realizada como descrito no item 3.7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de plantas de fumo e colonização radicular

Os resultados de massa de matéria seca da parte aérea, massa de matéria fresca das raízes e a porcentagem de colonização das raízes de fumo são apresentados na Tabela 1. Embora a massa de matéria fresca do sistema radicular tenha permanecido praticamente inalterada, pode-se observar um grande aumento (aproximadamente três vezes) da massa de matéria seca da parte aérea no período de 8 semanas após transplântio (SAT), com relação à 4 SAT. Não houve diferença significativa da MFSR e da MSPA entre os tratamentos não-inoculado e inoculado (teste t, $p < 0,05$), indicando que as plantas possuem características de crescimento semelhantes e as diferenças na expressão gênica podem ser atribuídas à formação da micorriza e não à uma alteração no estado nutricional das plantas inoculadas. A maior taxa de colonização foi obtida com 8 SAT (teste t, $p < 0,05$). Plantas não-inoculadas não apresentaram colonização (Tabela 1).

4.2. Extração de RNA total

As quantidades totais de RNA (por grama de raiz), determinadas por espectrofotometria, extraído de raízes inoculadas e não-inoculadas, 4 e 8 semanas após o transplântio (Ni4, Gi4, Ni8, Gi8), foram: Ni4 = 78 μ g; Gi4 = 72 μ g; Ni8 = 42 μ g; Gi8 = 48 μ g.

Tabela 1. Massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), massa de matéria fresca do sistema radicular (MFSR) e porcentagem de colonização das raízes de plantas de fumo não-inoculadas ou inoculadas com *Glomus intraradices*, 4 e 8 semanas após transplantio.

Tratamento	Parâmetro avaliado		
	MSPA (g)	MFSR (g)	Colonização (%)
<u>4 semanas após transplantio</u>			
<i>Não-inoculado</i>	8,8±0,2	41,1±2,6	0
<i>Inoculado</i>	8,0±0,3	39,1±1,3	31±2
<u>8 semanas após transplantio</u>			
<i>Não-inoculado</i>	20,3±0,4	37,6±1,9	0
<i>Inoculado</i>	20,1±0,4	35,5±1,6	45±3

Os dados são médias de 10 repetições ± desvio padrão da média.

A integridade do RNA (Ni8 e Gi8) foi verificada por eletroforese em gel de agarose formaldeído e as bandas referentes aos RNAs 28S e 18S podem ser visualizadas por fluorescência em luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídeo (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos para as amostras Ni4 e Gi4 (dados não apresentados).

O tratamento das amostras de RNA total com DNase, antes da síntese de cDNA, é uma etapa essencial para a eficácia da técnica do DD. Traços de DNA genômico podem ser extraídos do tecido juntamente com o RNA, constituindo-se em uma contaminação indesejada. Na etapa de amplificação por PCR, este DNA contaminante pode ser preferencialmente amplificado, em detrimento do cDNA, comprometendo os resultados. O tratamento com DNase é uma etapa bastante delicada, uma vez que as amostras de RNA permanecem um longo período em condições que podem facilitar sua degradação por RNases, embora sejam adicionados à reação inibidores destas enzimas. A Figura 2 apresenta amostras de RNA (Ni8 e Gi8) após o tratamento com DNase, indicando que sua integridade foi mantida. Este RNA foi utilizado para a síntese do cDNA e amplificação por PCR, conforme descrito anteriormente.

4.3. Análise dos cDNAs amplificados

Em um primeiro momento, procurou-se marcar os cDNAs durante a PCR com α -P³³-dATP, separar os fragmentos por eletroforese em gel de sequenciamento e, a seguir, fazer autoradiografias, de acordo com o protocolo original do DD (Liang & Pardee, 1992).

Levando-se em consideração as dificuldades de manipulação em nosso laboratório, os problemas de saúde e ambientais resultantes de procedimentos envolvendo radiatividade, o protocolo original foi modificado, de modo a

Figura 1. Quantidades iguais de RNA total (3µg) extraído de raízes de fumo não-inoculadas (Ni8) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi8), 8 semanas após transplântio. MM - Marcador de massa molecular ("RNA ladder", Gibco).

Figura 2. Quantidades iguais de RNA total (3 μ g), após tratamento com DNase. **MM** - Marcador de massa molecular (“RNA ladder”, Gibco); **Ni8** - não-inoculado e **Gi8** - inoculado com *Glomus intraradices*, 8 semanas após transplântio.

possibilitar a visualização dos cDNAs em gel de poliacrilamida corado com prata ou em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

4.3.1. Visualização dos cDNAs amplificados pelo Método 1, em gel de poliacrilamida

A amplificação da primeira fita de cDNA utilizando-se dois iniciadores (Método 1), como descrito no protocolo original do DD, resulta em um grande número de fragmentos de massas moleculares diversas. A separação destes cDNAs por eletroforese em gel de agarose é inviável, uma vez que a resolução deste tipo de material é baixa, quando comparada à obtida em géis de poliacrilamida. Assim, foi desenvolvido um protocolo de coloração de géis de poliacrilamida com prata (Sanguinetti et al., 1994) para visualização dos fragmentos de cDNA amplificados com dois iniciadores. As Figuras 3 e 4 apresentam os resultados da amplificação de cDNAs, utilizando-se duas combinações de iniciadores (AP1/RP1 e AP2/RP1). Observa-se um grande número de fragmentos de elevado peso molecular ($> 500\text{pb}$), embora as condições de amplificação utilizadas, com período de extensão de 30 segundos à 72°C , favoreçam a amplificação de fragmentos menores que 500pb (Liang & Pardee, 1992).

Na Figura 3 (combinação de iniciadores AP1/RP1) são apresentadas réplicas da mesma reação de PCR. Embora tenham sido amplificadas exatamente nas mesmas condições, é possível observar grandes diferenças entre os padrões de bandejamento das amostras-réplica, o que constitui em um dos principais problemas do DD (Zhao et al., 1995). Essas diferenças exigem a realização de um maior número de reações para se poder identificar, com uma maior probabilidade, as bandas diferenciais. Na Figura 4 (combinação de iniciadores AP1/RP2) foram identificadas algumas bandas diferenciais, indicadas pelas setas. Observa-se tanto

Figura 3. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 1) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi), utilizando-se os iniciadores AP1/RP1. **MM** - Marcador de massa molecular ("Molecular marker" VIII, Boehringer Mannheim). Ni1 e Ni2, Gi1 e Gi2 constituem-se em produtos de amplificações independentes.

Figura 4. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 1) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi), utilizando-se os iniciadores AP2/RP1. MM - Marcador de massa molecular ("Molecular marker" VIII, Boehringer Mannheim). As setas indicam possíveis cDNAs diferenciais.

cDNAs induzidos (presentes somente nas amostras Gi), quanto cDNAs suprimidos (presentes somente nas amostras Ni).

4.3.2. Visualização dos cDNAs amplificados pelo Método 2, em gel de agarose

A amplificação dos cDNAs utilizando-se apenas um iniciador (Método 2) resulta em um menor número de fragmentos, quando comparado ao complexo padrão resultante da amplificação por dois iniciadores. Adicionalmente, as condições de amplificação utilizadas, com período de extensão de 2 minutos à 72°C, favorecem a síntese de fragmentos de massa molecular relativamente mais elevada, quando comparado com a técnica do DD convencional. Desta maneira, esses fragmentos podem ser facilmente separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídeo.

A utilização de géis de agarose para a análise dos produtos de PCR apresenta várias vantagens, em relação à géis de poliacrilamida, devido principalmente à facilidade de preparação e manuseio. Além disso, o tempo para a obtenção dos resultados é bastante reduzido e a documentação é facilmente executada fotografando-se o gel sob luz ultravioleta.

A estratégia de amplificação utilizando-se somente um iniciador e posterior análise em gel de agarose foi utilizada com sucesso por Delp et al. (1996), para a identificação de genes modulados durante a formação de micorrizas arbusculares. Deve-se levar em consideração que, apesar das inúmeras vantagens do método, o número de bandas obtidas no gel de agarose é reduzido, quando comparado ao número obtido nos géis de poliacrilamida com cDNAs amplificados pelo Método 1. Consequentemente, as chances de se identificar bandas diferenciais também são reduzidas. Uma maneira de contornar esse problema seria realizar um maior número de reações com diferentes iniciadores

aleatórios, possibilitando, assim, a obtenção de um maior número de bandas, considerando-se o número total de reações. Nesse sentido, as amostras de cDNA provenientes de raízes de fumo não-inoculadas e inoculadas foram amplificadas utilizando-se 5 diferentes iniciadores aleatórios, sendo que apenas um, o iniciador B03, permitiu a identificação de bandas diferenciais. A utilização dos outros iniciadores não resultou em amplificação ou os padrões de bandejamento entre as amostras Ni e Gi foram exatamente os mesmos.

A Figura 5 apresenta o resultado da amplificação de amostras de cDNA sintetizadas com o iniciador ancorado AP1 e amplificadas com os iniciadores aleatórios B03 ou B07. Um cDNA diferencial de aproximadamente 800pb foi identificado na amostra Gi (indicado pela seta) amplificada com o iniciador B03, enquanto o padrão de amplificação obtido com o iniciador B07 mostrou-se idêntico para as amostras Ni e Gi. Pode-se observar que o padrão de bandejamento obtido é claramente dependente do iniciador utilizado.

O resultado da amplificação de amostras de cDNA sintetizadas com o iniciador ancorado AP2 e amplificadas com o iniciador aleatório B03 é apresentado na Figura 6. Dois cDNAs diferenciais, de aproximadamente 800 e 850pb, foram identificados na amostra Gi (indicados pelas setas).

Réplicas destas reações de PCR foram realizadas, obtendo-se os mesmos resultados (dados não apresentados).

4.4. Isolamento dos cDNAs diferenciais

4.4.1. De géis de poliacrilamida

Os cDNAs diferenciais identificados nos géis de poliacrilamida corados com prata, indicados pelas setas na Figura 4, foram eluídos do gel conforme descrito anteriormente. Dois destes cDNAs foram utilizados em estudos

Figura 5. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 2) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (Ni) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (Gi). O cDNA foi sintetizado com o iniciador AP1 e amplificado com os iniciadores B03 ou B07, conforme indicado. O fragmento diferencial é indicado pela seta. MM - Marcador de massa molecular ("Molecular marker" VIII, Boehringer Mannheim).

Figura 6. Produtos da amplificação da primeira fita de cDNA (Método 2) de amostras de RNA extraídas de raízes não-inoculadas (**Ni**) ou inoculadas com *Glomus intraradices* (**Gi**). O cDNA foi sintetizado com o iniciador AP2 e amplificado com o iniciador B03. Os fragmentos diferenciais são indicados pelas setas. **MM** - Marcador de massa molecular (“Molecular marker” VIII, Boehringer Mannheim).

posteriores para confirmação do padrão de expressão diferencial por análise de “northern blot”. No entanto, este padrão não pôde ser confirmado (dados não apresentados), e com grande probabilidade esses cDNAs seriam “falsos positivos”, um dos principais problemas associados à técnica do DD (Zhao et al., 1995; Zhang et al., 1996; Poirier et al., 1997 e comunicação pessoal). A fim de se evitar a obtenção de “falsos positivos” e contornar outras dificuldades associadas ao DD, como por exemplo a baixa reprodutibilidade, Zhao et al. (1995) sugerem o uso de iniciadores mais longos, portanto mais específicos, e temperaturas de pareamento mais elevadas durante a amplificação por PCR, aumentando ainda mais a especificidade da amplificação.

O procedimento de eluição e reamplificação dos cDNAs diferenciais de géis de poliacrilamida corados com prata (item 3.6.1, Metodologia) apresentou índices bastante baixos de reprodutibilidade. No entanto, devido à pequena quantidade de DNA presente no gel de poliacrilamida, torna-se difícil sua visualização e manipulação, sem antes proceder a reamplificação por PCR.

Acredita-se que a dificuldade em se reamplificar os fragmentos de cDNA eluídos dos géis de poliacrilamida corados com prata deve-se à presença de algum composto inibidor da DNA polimerase Taq presente no solvente, dificultando a reação de amplificação. É possível que a própria prata utilizada na coloração do gel esteja agindo como inibidor da reação de amplificação, uma vez já ter sido relatada a possibilidade de que certos metais podem prejudicar a reação (Sambrook et al., 1989). Assim, sugere-se que, antes da amplificação, esse metal seja removido da solução a fim de que a reação de PCR possa ser realizada eficientemente. A remoção de metais utilizando resinas como Chelex (BioRad) tem sido feita com sucesso para a amplificação de DNA extraído de esporos de fungos micorrízicos-arbusculares (Wyss & Bonfante, 1993), e poderia facilitar também a reamplificação de DNA eluído de géis de poliacrilamida corados com prata.

4.4.2. De géis de agarose

Os cDNAs diferenciais identificados em géis de agarose, indicados pelas setas nas Figuras 5 e 6, foram eluídos conforme descrito anteriormente. Uma vez que a quantidade inicial de DNA a ser eluído do gel de agarose é maior que a quantidade normalmente presente em uma banda de gel de poliacrilamida, o processo de eluição é facilitado, não havendo necessidade de realizar-se reamplificação das amostras para se obter material suficiente para as manipulações posteriores.

A eluição dos cDNAs em membranas de diálise e a purificação com fenol:clorofórmio, seguida de precipitação em etanol, resultou em altos índices de recuperação. A Figura 7 apresenta o resultado da eletroeluição dos três cDNAs isolados de géis de agarose, mostrando as bandas de massa molecular esperada. O fragmento de 800pb indicado na Figura 5 foi denominado NtGi1 e os fragmentos de 850 e 800pb, indicados na Figura 6, foram denominados NtGi2 e NtGi3, respectivamente.

4.5. Confirmação da expressão diferencial por “dot blot”

Os clones NtGi1, NtGi2 e NtGi3 isolados de gel de agarose, foram marcados com DIG-11-dUTP em reações de PCR e hibridizados com o produto total da amplificação do cDNA de amostras Ni8, Gi8 ou com os próprios cDNAs isolados, imobilizados em membranas de náilon.

Este experimento de hibridização por “dot blot” foi realizado com a finalidade de eliminar a possibilidade de estes fragmentos de cDNA estarem presentes também nas amostras de raízes não-inoculadas, mas em quantidades abaixo do limite de detecção da técnica de visualização utilizada.

Figura 7. Resultado da eluição dos cDNAs diferenciais isolados de géis de agarose. **MM** - Marcador de massa molecular (“Low DNA mass ladder”, Gibco). NtGi1, NtGi2 e NtGi3 são diferentes cDNAs diferenciais provenientes da amplificação da primeira fita de cDNA de amostras de raízes micorrizadas por *Glomus intraradices*.

A Figura 8 apresenta os resultados deste experimento. Todos os controles positivos apresentaram sinal de hibridização, enquanto nenhum sinal foi observado no controle negativo (contendo somente solução tampão; dado não apresentado), indicando a eficiência da hibridização. Os clones NtGi1 e NtGi2 apresentaram sinal mais intenso na amostra de raízes inoculadas (Gi), quando comparado com o sinal obtido na amostra de raízes não-inoculadas (Ni). O clone NtGi3 somente apresentou sinal de hibridização em amostras de raízes inoculadas, sugerindo que ele codifica um gene micorriza-específico.

Com a finalidade de dar suporte a estes dados de expressão diferencial, foi efetuada nova extração de RNA total, nova síntese de cDNA e nova amplificação por PCR, através do Método 2. A análise por eletroforese em gel de agarose apresentou os mesmos fragmentos diferenciais identificados anteriormente, com a massa molecular esperada, confirmando a expressão diferencial (dados não apresentados).

Embora o protocolo original do DD comente a necessidade de confirmação da expressão diferencial dos clones identificados através de hibridização em “northern blot”, muitos autores têm tido dificuldade em obter resultados positivos, e métodos alternativos têm sido desenvolvidos (Vögeli-Lange et al., 1996b; Zhang et al., 1996; Poirier et al., 1997). Estes métodos consistem, basicamente, em marcar o produto total da amplificação e hibridizá-lo com cDNAs diferenciais imobilizados em membranas. Este tipo de abordagem facilita a identificação de cDNAs diferenciais quando o número de clones a serem testados é grande, uma vez que todos podem ser testados em uma única membrana. No presente trabalho, como haviam apenas três clones diferenciais putativos, optou-se por marcá-los e hibridizá-los contra o produto total da amplificação imobilizado nas membranas. Embora metodologicamente diferentes, os dois tipos de abordagem baseiam-se no mesmo princípio.

Figura 8. Resultado da hibridização do produto total da amplificação dos cDNAs imobilizados em membranas de náilon, com os clones **NtGi1**, **NtGi2** ou **NtGi3**, marcados com DIG-11-dUTP. **Controle** - cDNA de cada clone; **Ni** - produto total da amplificação de amostras de cDNA de raízes não-inoculadas; **Gi** - produto total da amplificação de amostras de cDNA de raízes inoculadas com *Glomus intraradices*.

Os dados obtidos por hibridização em “dot blot”, juntamente com a repetição dos padrões de bandejamento de cDNAs sintetizados a partir de RNA obtido de extrações independentes, confirmaram a expressão diferencial dos cDNAs isolados, possibilitando a continuidade dos processos de clonagem e sequenciamento dos cDNAs.

4.6. Clonagem dos cDNAs diferenciais

Um total de 13 colônias brancas do clone NtGi1, 11 colônias brancas do NtGi2 e 10 colônias brancas do NtGi3 foram isoladas e multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina.

A mini-preparação plasmidial e digestão por enzimas de restrição que flanqueiam os insertos revelou a presença de 2 recombinantes para NtGi1, 1 recombinante para NtGi2 e 1 recombinante para NtGi3, resultando em eficiência de ligação de aproximadamente 15, 9 e 10%, respectivamente.

4.7. Sequenciamento dos cDNAs e análise das sequências

As sequências parciais de nucleotídeos e as sequências de aminoácidos deduzidas correspondentes, obtidas para os clones NtGi1, NtGi2 e NtGi3, podem ser visualizadas nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente. A Figura 12 apresenta o alinhamento das sequências de nucleotídeos e a Figura 13 apresenta o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas, para os três clones. Os clones são idênticos, pelo menos nos segmentos coincidentes, já que o clone NtGi1 abrange uma porção maior da região 3' do gene. O clone NtGi2 mostra um certo grau de homologia com os clones NtGi1 e NtGi3, mas possui segmentos não homólogos característicos (Figuras 12 e 13).

```

1                               59
NTTNNTATACNGAAAGAGAGCCACCNAATACGAAAAACGTAATTGGAAAGAAAGAGCT
  X   Y   T   E   R   E   P   P   K   Y   E   K   R   N   W   K   E   R   A
60                               119
TTTACTGTCGGAATTGGAGTTCCTGTTGGATCTGGGAAAACAGCATTAAATGTTGGCATT
  F   T   V   G   I   G   V   P   V   G   S   G   K   T   A   L   M   L   A   L
120                               179
TGCAAAGCTTTAAGAGATCAATACTCTATTGCAGCCGTAACAAACGATATTTTCACCAAA
  C   K   A   L   R   D   Q   Y   S   I   A   A   V   T   N   D   I   F   T   K
180                               239
GAAGATACAGAATTCCTTAGTTCGTAATAATGCTTTGCCAGCAGAACGTATTCGTGCAATA
  E   D   T   E   F   L   V   R   N   N   A   L   P   A   E   R   I   R   A   I
240                               299
GAAACTGGTGGATGTCCACATGCTGCTATCAGAGAAGATATATCTGCTAATTTGGGTGCT
  E   T   G   G   C   P   H   A   A   I   R   E   D   I   S   A   N   L   G   A
300                               359
CTCGAAGAATTACATGCTAAATTTAATTCTCAAATATTACTTGTGAAAGTGGTGGCGAT
  L   E   E   L   H   A   K   F   N   S   Q   I   L   L   V   E   S   G   G   D
360                               419
AATTTAGCTGCCAATTATTCTCGAGAATTAGCGGATTATATTATCTATGTTATTGATGTA
  N   L   A   A   N   Y   S   R   E   L   A   D   Y   I   I   Y   V   I   D   V
420                               479
GCGGGTGGTGATAAAATTCCAAGGAAAGGAGGTCCAGGCATTACACAATCAGATCTTTTA
  A   G   G   D   K   I   P   R   K   G   G   P   G   I   T   Q   S   D   L   L
480                               539
ATCATTAATAAAACTGATTTAGCTGAAATTGTTGGGGCAGATTTGGGAGTCGTGGACAGG
  I   I   N   K   T   D   L   A   E   I   V   G   A   D   L   G   V   V   D   R
540                               599
GATGCTCGTAAAATGAGGGAGAGTGGACCGACAATATTTACTCAAGTGAAGAACGGCGTT
  D   A   R   K   M   R   E   S   G   P   T   I   F   T   Q   V   K   N   G   V
600                               659
GGAATCCGCAGGTCGTTGAATTGATATTGAGTGCTTGGAGGGCGTCTGGTGCTGATAAT
  G   I   P   Q   V   V   E   L   I   L   S   A   W   R   A   S   G   A   D   N
660                               719
TTTTAAGCATTGTCTGAAGTAATCATCATGTTTGTCTGAAGTGGGCTAGAGCGGCCGCCACC
  F   *   A   L   S   K   *   S   S   C   L   S   K   W   A   R   A   A   A   T
720                               736
GCGTGGACTCCANTTTG
  A   W   T   P   X

```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi1. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. O sinal * indica o códon de terminação. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor.


```

1
CAAACTGGACTCCACGCGGTGGCGGCCGCTCTAGCCCACTTCGACAACAGGAAGTGCTCAT
61
  K  L  D  S  T  R  W  R  P  L  *  P  T  S  T  T  G  S  A  H
62
GGACATGGGCATGATCATGGTGTAGGAGAACATGGGCACACTCATGAACAATTAGATAAT
121
  G  H  G  H  D  H  G  V  G  E  H  G  H  T  H  E  Q  L  D  N
122
CCCGGTAAATATACCGAAAGAGAGCCACCAAAATACGAAAAACGTAATTGGAAAGAAAGA
181
  P  G  K  Y  T  E  R  E  P  P  K  Y  E  K  R  N  W  K  E  R
182
GCTTTTACTGTGCGAATTGGAGGTCCTGTTGGATCTGGGAAAACAGCATTAAATGTTGGCA
241
  A  F  T  V  G  I  G  G  P  V  G  S  G  K  T  A  L  M  L  A
242
TTATGCAAAGCTTTAAGAGATCAATACTCTATTGCAGCCGTAACAAACGATATTTTCACC
301
  L  C  K  A  L  R  D  Q  Y  S  I  A  A  V  T  N  D  I  F  T
302
AAAGAAGATACAGAATTCTTAGTTCGTAATAATGCTTTGCCAGCAGAACGTATTCGTGCA
361
  K  E  D  T  E  F  L  V  R  N  N  A  L  P  A  E  R  I  R  A
362
ATAGAAACTGGTGGATGTCTACATGCTGCTATCAGAGAAGATATATCTGCTAATTTGGGT
421
  I  E  T  G  G  C  L  H  A  A  I  R  E  D  I  S  A  N  L  G
422
GCTCTCGAAGAATTACATGCTAAATTTAATTCTCAAATATTACTTGTTGAAAGTGGTGGC
481
  A  L  E  E  L  H  A  K  F  N  S  Q  I  L  L  V  E  S  G  G
482
GATAATTTAGCTGCCAATTATTCTCGAGAATTAGCGGATTATATTATCTATGGTAAGACT
541
  D  N  L  A  A  N  Y  S  R  E  L  A  D  Y  I  I  Y  G  K  T
542
ATACCATTTTCATCNTCATAAAATTAATTAACCTTATAGTTAAGCTNTCCTANATNTTATTTT
601
  I  P  F  H  X  H  K  L  I  N  L  *  L  S  X  P  X  X  Y  F
602
ACATANTTTATTGATGTACCGGTGGTGATAAAATTCCAAGGAAAGGAGGTCCNGGCATTAC
661
  T  X  L  L  M  Y  R  W  *  *  N  S  K  E  R  R  S  X  H  Y
662
ACAATCAGATCTTTTANTCNNTAATAAAACTGATTTANCTGAANATTGTTTGGGGGCCAT
721
  T  I  R  S  F  X  X  *  *  N  *  F  X  *  X  L  F  G  G  H
722
TTGGGAATCCTGNACAGGGCTCN
744
  L  G  I  L  X  R  A

```

Figura 10. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi2. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. O sinal * indica o códon de terminação. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor.

```

1                                     60
GGATCCGCCCCANTTGGACAACAGGAAGTGTTCATGGACATGGGCATGATCATGGTGTA
  G S A P X G Q Q E V F H G H G H D H G V
61                                     120
GGAGAACATGGGCACACTCATGAACAATTAGATAATCCCGGTAAATATACCGAAAGAGAG
  G E H G H T H E Q L D N P G K Y T E R E
121                                     180
CCACCAAAATACGAAAAACGTAATTGGAAAGAAAGAGCTTTTACTGTCGGAATTGGAGGT
  P P K Y E K R N W K E R A F T V G I G G
181                                     240
CCTGTTGGATCTGGGAAAAACAGCATTAATGTTGGCATTATGCAAAGCTTTAAGAGATCAA
  P V G S G K T A L M L A L C K A L R D Q
241                                     300
TACTCTATTGCAGCCGTAACAAACGATATTTTCACCAAAGAAGATACAGAATTCTTAGTT
  Y S I A A V T N D I F T K E D T E F L V
301                                     360
CGTAATAATGCTTTGCCAGCAGAACGTATTCGTGCAATAGAACTGGTGGATGTCCACAT
  R N N A L P A E R I R A I E T G G C P H
361                                     420
GCTGCTATCAGAGGAGATATATCTGCTAATTTGGGTGCTCTCGAAGAATTGCATGCTAAA
  A A I R G D I S A N L G A L E E L H A K
421                                     480
TTTAATTCTCAAATATTACTTGTGAGAGTGGTGGCGATAATTTAGCTGCCAATTATTCT
  F N S Q I L L V E S G G D N L A A N Y S
481                                     540
CGAGAATTAGCGGATTATATTATCTATGTTATTGATGTAGCGGGTGGTGACAAAATTCCA
  R E L A D Y I I Y V I D V A G G D K I P
541                                     600
AGGAAAGGAGGTCCAGGCATTACACAATCAGATCTTTTAATCATTAAATAAACTGATTTA
  R K G G P G I T Q S D L L I I N K T D L
601                                     626
GCTGAAATTGTTGGGGCAGATTTGGG
  A E I V G A D L

```

Figura 11. Sequência de nucleotídeos do clone NtGi3. A sequência de aminoácidos correspondente é indicada para cada códon. A sequência em negrito corresponde a um fragmento do vetor.

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
3	-----	-----	GGGGAT	CCGCCCCANTTGGAC	AACAGGAAGTGTTTC	ATGGACATGGGCATG	ATCATGGTGTAGGAG					66
2	CAAACTGGACTCCAC	GCGGTGGCGGCCGCT	CTAGCCCACTTCGAC	AACAGGAAGTGCT-C	ATGGACATGGGCATG	ATCATGGTGTAGGAG						89
91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
1	-----	-----	-----	NTTNNIATA	CNGAAAGAGAGCCAC	CNAAATACGAAAAAC	GTAATTGGAAGAAA					54
3	AACATGGGCACACTC	ATGAACAATTAGATA	ATCCCGGTAAATATA	CCGAAAGAGAGCCAC	CAAAATACGAAAAAC	GTAATTGGAAGAAA						156
2	AACATGGGCACACTC	ATGAACAATTAGATA	ATCCCGGTAAATATA	CCGAAAGAGAGCCAC	CAAAATACGAAAAAC	GTAATTGGAAGAAA						179
181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
1	GAGCTTTTACTGTCG	GAATTGGAGTTCCTG	TTGGATCTGGGAAAA	CAGCATTAATGTTGG	CATTATGCAAAGCTT	TAAGAGATCAATACT						144
3	GAGCTTTTACTGTCG	GAATTGGAGTTCCTG	TTGGATCTGGGAAAA	CAGCATTAATGTTGG	CATTATGCAAAGCTT	TAAGAGATCAATACT						246
2	GAGCTTTTACTGTCG	GAATTGGAGTTCCTG	TTGGATCTGGGAAAA	CAGCATTAATGTTGG	CATTATGCAAAGCTT	TAAGAGATCAATACT						269
271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
1	CTATTGCAGCCGTAA	CAAACGATATTTTCA	CCAAAGAAGATACAG	AATTCTTAGTTCGTA	ATAATGCTTTGCCAG	CAGAACGTATTCGTG						234
3	CTATTGCAGCCGTAA	CAAACGATATTTTCA	CCAAAGAAGATACAG	AATTCTTAGTTCGTA	ATAATGCTTTGCCAG	CAGAACGTATTCGTG						336
2	CTATTGCAGCCGTAA	CAAACGATATTTTCA	CCAAAGAAGATACAG	AATTCTTAGTTCGTA	ATAATGCTTTGCCAG	CAGAACGTATTCGTG						359
361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
1	CAATAGAACTGGTG	GATGTCCACATGCTG	CTATCAGAGAAGATA	TATCTGCTAATTTGG	GTGCTCTCGAAGAAT	TACATGCTAAATTTA						324
3	CAATAGAACTGGTG	GATGTCCACATGCTG	CTATCAGAGAAGATA	TATCTGCTAATTTGG	GTGCTCTCGAAGAAT	TACATGCTAAATTTA						426
2	CAATAGAACTGGTG	GATGTCTACATGCTG	CTATCAGAGAAGATA	TATCTGCTAATTTGG	GTGCTCTCGAAGAAT	TACATGCTAAATTTA						449
451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
1	ATTCTCAAATATTAC	TTGTTGAAAGTGGTG	GCGATAATTTAGCTG	CCAATTATTCTCGAG	AATTAGCGGATTATA	TTATCTATG-----						408
3	ATTCTCAAATATTAC	TTGTTGAGAGTGGTG	GCGATAATTTAGCTG	CCAATTATTCTCGAG	AATTAGCGGATTATA	TTATCTATG-----						510
2	ATTCTCAAATATTAC	TTGTTGAAAGTGGTG	GCGATAATTTAGCTG	CCAATTATTCTCGAG	AATTAGCGGATTATA	TTATCTATGTTAAGA						539
541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630	
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TTATTGA	TGTAGCGGGTGGTGA		430
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TTATTGA	TGTAGCGGGTGGTGA		532
2	CTATACCATTTCATC	NTCATAAATTAATTA	ACTTATAGTTAAGCT	NTCCTANATNTTATT	TTACATANTTATTGA	TGTACCGG-TGGTGA						628
631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720	
1	TAAAATTCCAAGGAA	AGGAGGTCCAGGCAT	TACACAATCAGATCT	TTTAATCATTAATAA	AACTGATTAGCTGA	AATTG--TTGGGGCA						518
3	CAAAATTCCAAGGAA	AGGAGGTCCAGGCAT	TACACAATCAGATCT	TTTAATCATTAATAA	AACTGATTAGCTGA	AATTG--TTGGGGCA						620
2	TAAAATTCCAAGGAA	AGGAGGTCCNGGCAT	TACACAATCAGATCT	TTTANTCNNTAATAA	AACTGATTANCTGA	ANATTGTTGGGGGC						718
721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810	
1	GATTTGGGAGTCTGTG	GACAGGGATGCTCGT	AAAATGAGGGAGAGT	GGACCGACAATATTT	ACTCAAGTGAAGAAC	GGCGTTGGAATTCCG						608
3	GATTTGGG-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	628
2	CATTTGGGAATCCTG	NACAGGGCTCN----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	744
811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900	
1	CAGGTGCGTTGAATTG	ATATTGAGTGCTTGG	AGGGCGTCTGGTGCT	GATAATTTTAAAGCA	TTGTGCAAGTAATCA	TCATGTTTGTGCAAG						698
3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	628
2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	744
901	915	916	930	931	945							
1	TGGGCTAGAGCGGCC	GCCACCGCGTGGACT	CCANTTTG			736						
3	-----	-----	-----			628						
2	-----	-----	-----			744						

Figura 12. Resultado do alinhamento das sequências de nucleotídeos dos clones 1 - NtGi1, 2 - NtGi2 e 3 - NtGi3. As sequências em negrito correspondem a fragmentos do vetor.

```

      1           15 16           30 31           45 46           60 61           75 76           90
2 KLDSTRWRPLPTSTT GSA-----HGHHG HDHGVGEHGHGTHEQL DNPgKYTEREPPKYE KRNWKERAFTVGIGG PVGSGKTALMLALCK 82
3 ----- GSAPXGQQEVFHHG HDHGVGEHGHGTHEQL DNPgKYTEREPPKYE KRNWKERAFTVGIGG PVGSGKTALMLALCK 75
1 ----- ----- ----- -X-TEREPPKYE KRNWKERAFTVGIGV PVGSGKTALMLALCK 41

      91           105 106           120 121           135 136           150 151           165 166           180
2 ALRDQYSIAAVTNDI FTKEDTEFLVRNNAL PAERIRAIETGGCLH AAIREDISANLGALE ELHAKFNSQILLVES GGDNLAANYSRELAD 172
3 ALRDQYSIAAVTNDI FTKEDTEFLVRNNAL PAERIRAIETGGCPH AAIRGDISANLGALE ELHAKFNSQILLVES GGDNLAANYSRELAD 165
1 ALRDQYSIAAVTNDI FTKEDTEFLVRNNAL PAERIRAIETGGCPH AAIREDISANLGALE ELHAKFNSQILLVES GGDNLAANYSRELAD 131

      181           195 196           210 211           225 226           240 241           255 256           270
2 YIIY-----GKTIP FHxHKLINLLSXPXX YFTXLLMYRWNSKER RSXHYTIRSFXXNFX XLFGGHLGILXRA-- ----- 239
3 YIIYVIDVAGGDKIP RK-----GGPGI TQSDLLIIN----- -----KTDLA EIVGADL----- ----- 208
1 YIIYVIDVAGGDKIP RK-----GGPGI TQSDLLIIN----- -----KTDLA EIVGADLGVVDRDAR KMRESGPTIFTQVKN 197

      271           285 286           300 301           315
2 ----- ----- ----- ----- 239
3 ----- ----- ----- ----- 208
1 GVGIPQVVELILSAW RASGADNFALSKSSC LSKWARAAATAWTPX 242

```

Figura 13. Resultado do alinhamento das sequências de aminoácidos dos clones 1 - NtGi1, 2 - NtGi2 e 3 - NtGi3. As sequências em negrito correspondem a fragmentos do vetor.

Os três clones são homólogos à genes que codificam proteínas acessórias da urease (UreG) em diferentes bactérias e *Arabidopsis*, em nível de nucleotídeos e aminoácidos. O clone NtGi1 apresentou 55 a 70% de identidade em nível de nucleotídeos (Tabela 2) e 33 a 66% de identidade em nível de aminoácidos (Tabela 5), com sequências homólogas nos bancos de dados. O clone NtGi2 apresentou 55 a 66% de identidade em nível de nucleotídeos (Tabela 3) e 41 a 65% de identidade em nível de aminoácidos (Tabela 6), com sequências homólogas nos bancos de dados. O clone NtGi3 apresentou 54 a 75% de identidade em nível de nucleotídeos (Tabela 4) e 40 a 81% de identidade em nível de aminoácidos (Tabela 7), com sequências homólogas nos bancos de dados.

O alinhamento das proteínas, deduzidas a partir da sequência de aminoácidos dos clones, com proteínas acessórias da urease e outras proteínas homólogas de bactérias e *Arabidopsis*, é apresentado na Figura 14. A análise mais detalhada das proteínas codificadas pelos clones NtGi2 e NtGi3 mostra a presença de sítios putativos de glicosilação, de ligação ATP/GTP e um sítio de fosforilação por quinase de tirosina (Tabela 8). Os sítios ativos de ligação de ATP/GTP assim como os sítios de glicosilação, são conservados em todas as proteínas acessórias da urease, enquanto que os sítios de fosforilação ocorrem somente em NtGi2 e NtGi3, sugerindo regulação diferencial através de um mecanismo de transdução de sinais envolvendo fosforilação/desfosforilação.

A origem do gene, se vegetal ou fúngica, ainda não foi determinada. Essa determinação será feita através da amplificação de fragmentos específicos desses clones a partir de DNA genômico de plantas de fumo e *Glomus intraradices*.

Acredita-se que proteínas acessórias da urease são responsáveis pela incorporação de níquel na estrutura da urease, uma metaloproteína. Em *Klebsiella aerogenes*, os genes codificando urease foram bem caracterizados e estão organizados em um operon contendo quatro genes acessórios (*ureD*, *ureE*, *ureF* e

Tabela 2. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone **NtGi1** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final
<i>Synechocystis</i> sp.	dbj/D90902/D90902	70	$1,1 \times 10^{-40}$	340-604
<i>Streptococcus salivarius</i>	gb/U35248/SSU35248	65	$2,3 \times 10^{-33}$	343-517
		62		146-325
<i>Bacillus termofilico</i>	dbj/D14439/BACUREA	62	$3,9 \times 10^{-28}$	337-625
<i>Haemophilus influenzae</i>	gb/U32736/HIU32736	62	$4,1 \times 10^{-25}$	331-592
<i>Staphylococcus xylosus</i>	emb/Z35136/SXUREFG	60	$4,5 \times 10^{-23}$	343-626
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	gb/L40489/UREUREASEA	68	$2,4 \times 10^{-20}$	146-320
<i>Bacillus pasteurii</i>	gb/U29368/BPU29368	59	$1,9 \times 10^{-18}$	67-330
<i>Klebsiella aerogenes</i>	gb/M36068/KPNUREX	55	$8,2 \times 10^{-9}$	66-305

Tabela 3. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone **NtGi2** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final
<i>Bacillus pasteurii</i>	gb/U29368/BPU29368	59	$1,9 \times 10^{-18}$	192-455
<i>Streptococcus salivarius</i>	gb/U35248/SSU35248	61	$5,0 \times 10^{-17}$	271-450
		66		468-536
<i>Klebsiella aerogenes</i>	gb/M36068/KPNUREX	55	$8,2 \times 10^{-9}$	191-431

Tabela 4. Nível de identidade da sequência de nucleotídeos do clone **NtGi3** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final
<i>Synechocystis</i> sp.	dbj/D90902/D90902	75	$5,3 \times 10^{-33}$	440-626
<i>Bacillus</i> termofílico	dbj/D14439/BACUREA	67	$8,6 \times 10^{-22}$	437-625
<i>Staphylococcus xylosus</i>	emb/Z35136/SXUREFG	69	$6,5 \times 10^{-21}$	451-617
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	gb/L40489/UREUREASEA	68	$1,9 \times 10^{-20}$	246-420
<i>Bacillus pasteurii</i>	gb/U29368/BPU29368	58	$8,7 \times 10^{-18}$	167-430
<i>Haemophilus influenzae</i>	gb/U32736/HIU32736	63	$1,1 \times 10^{-16}$	431-623
<i>Streptococcus salivarius</i>	gb/U35248/SSU35248	61	$9,4 \times 10^{-13}$	246-425
<i>Klebsiella aerogenes</i>	gb/M36068/KPNUREX	54	$1,4 \times 10^{-9}$	166-422

Tabela 5. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone **NtGi1** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final (nucleotídeo)
<i>Synechocystis</i> sp.	gi/1652048	63	$7,5 \times 10^{-80}$	333-626
		63		66-323
<i>Escherichia coli</i>	sp/Q03287/UREG ECOLI	59	$1,0 \times 10^{-75}$	324-629
		65		66-311
<i>Klebsiella aerogenes</i>	sp/P18319/UREG KLEAE	57	$3,4 \times 10^{-74}$	324-626
		58		66-356
<i>Haemophilus influenzae</i>	sp/P44396/UREG HAEIN	61	$8,0 \times 10^{-74}$	330-617
		52		36-323
<i>Proteus mirabilis</i>	sp/Q06206/UREG PROMI	53	$5,9 \times 10^{-73}$	324-629
		65		66-311
<i>Helicobacter pylori</i>	sp/Q09066/UREG HELPY	55	$1,1 \times 10^{-72}$	324-626
		53		66-356
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sp/P50051/UREG MYCTU	54	$1,4 \times 10^{-72}$	333-650
		53		66-311
<i>Bacillus</i> sp.	sp/Q07403/UREG BACSB	54	$4,9 \times 10^{-67}$	330-626
		57		51-131
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	gi/1204033	50	$1,3 \times 10^{-63}$	330-626
		54		141-356
		44		51-131
<i>Streptococcus salivarius</i>	gi/1167547	50	$9,0 \times 10^{-63}$	333-626
		53		144-335
		44		51-137
<i>Yersinia enterocolitica</i>	sp/P42871/UREG YEREN	51	$2,1 \times 10^{-62}$	324-629
		43		213-356
		52		48-110
		50		156-203
<i>Staphylococcus xylosus</i>	sp/P42877/UREG STAXY	51	$4,4 \times 10^{-62}$	330-626
		52		66-311
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	sp/P52319/UREG YERPS	62	$1,3 \times 10^{-51}$	327-500
		43		213-356
		46		33-110
		50		156-203
<i>Bacillus pasteurii</i>	gi/915227	57	$2,7 \times 10^{-31}$	66-326
<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi/17445	66	$5,8 \times 10^{-21}$	411-596
<i>Methanococcus jannaschii</i>	gi/1591146	33	$2,8 \times 10^{-14}$	402-626
		39		84-212
<i>Escherichia coli</i>	pir//A42598	52	$5,1 \times 10^{-5}$	249-356

Tabela 6. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone **NtGi2** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final (nucleotídeo)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	sp/P18319/UREG KLEAE	58	$9,0 \times 10^{-60}$	191-481
		60		449-532
<i>Escherichia coli</i>	sp/Q03287/UREG ECOLI	65	$2,3 \times 10^{-59}$	191-436
		64		449-532
<i>Helicobacter pylori</i>	sp/Q09066/UREG HELPY	53	$8,4 \times 10^{-59}$	191-481
		53		449-532
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sp/P50051/UREG MYCTU	53	$1,3 \times 10^{-57}$	191-481
		56		458-532
<i>Haemophilus influenzae</i>	sp/P44396/UREG HAEIN	52	$1,7 \times 10^{-57}$	161-448
		53		455-532
<i>Proteus mirabilis</i>	sp/Q06206/UREG PROMI	65	$3,5 \times 10^{-57}$	191-436
		61		449-526
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	gi/1204033	52	$7,2 \times 10^{-53}$	266-481
		57		455-532
		48		176-256
<i>Streptococcus salivarius</i>	gi/1167547	51	$4,8 \times 10^{-52}$	269-460
		56		458-532
		48		176-262
<i>Bacillus</i> sp.	sp/Q07403/UREG BACSB	57	$2,7 \times 10^{-51}$	191-436
		57		455-532
<i>Synechocystis</i> sp.	gi/1652048	63	$1,4 \times 10^{-49}$	191-448
		56	$1,7 \times 10^{-44}$	458-532
<i>Staphylococcus xylosus</i>	sp/P42877/UREG STAXY	52	$4,1 \times 10^{-49}$	191-436
		57		455-532
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	sp/P52319/UREG YERPS	41	$2,2 \times 10^{-36}$	338-481
		51	$1,5 \times 10^{-10}$	452-532
		50	$2,2 \times 10^{-36}$	158-235
		50	$2,2 \times 10^{-36}$	281-328
<i>Bacillus pasteurii</i>	gi/915227	57	$6,9 \times 10^{-32}$	191-451
<i>Yersinia enterocolitica</i>	sp/P42871/UREG YEREN	41	$2,2 \times 10^{-30}$	338-481
		50	$1,0 \times 10^{-9}$	449-532
		57	$2,2 \times 10^{-30}$	173-235
		50	$2,2 \times 10^{-30}$	281-328

Tabela 7. Nível de identidade da sequência de aminoácidos do clone **NtGi3** com sequências homólogas de vários organismos em banco de dados.

Organismo	Nº de acesso	Identidade (%)	Probabilidade	Posição inicial-final (nucleotídeo)
<i>Synechocystis</i> sp.	gi/1652048	63	$2,7 \times 10^{-61}$	166-423
		73		433-624
<i>Klebsiella aerogenes</i>	sp/P18319/UREG KLEAE	58	$1,3 \times 10^{-66}$	166-456
		71		424-624
<i>Helicobacter pylori</i>	sp/Q09066/UREG HELPY	53	$1,9 \times 10^{-66}$	166-456
		71		424-624
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	sp/P50051/UREG MYCTU	54	$2,3 \times 10^{-66}$	166-456
		71		433-624
<i>Escherichia coli</i>	sp/Q03287/UREG ECOLI	65	$3,4 \times 10^{-66}$	166-411
		73		424-624
<i>Haemophilus influenzae</i>	sp/P44396/UREG HAEIN	52	$2,8 \times 10^{-65}$	136-423
		72		430-624
<i>Proteus mirabilis</i>	sp/Q06206/UREG PROMI	65	$1,8 \times 10^{-63}$	166-411
		64		424-624
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	gi/1204033	63	$5,4 \times 10^{-59}$	430-624
		52		241-456
		48		151-231
<i>Streptococcus salivarius</i>	gi/1167547	62	$2,6 \times 10^{-58}$	664-624
		51		244-435
		48		151-237
<i>Bacillus</i> sp.	sp/Q07403/UREG BACSB	57	$3,7 \times 10^{-58}$	166-411
		63		430-624
<i>Staphylococcus xylosus</i>	sp/P42877/UREG STAXY	52	$7,7 \times 10^{-56}$	166-411
		63		430-624
<i>Yersinia enterocolitica</i>	sp/P42871/UREG YEREN	61	$8,5 \times 10^{-54}$	424-624
		41		313-456
		57		148-210
		50		256-303
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	sp/P52319/UREG YERPS	62	$2,6 \times 10^{-51}$	427-600
		41		313-456
		50		133-210
		50		256-303
<i>Bacillus pasteurii</i>	gi/915227	57	$6,1 \times 10^{-32}$	166-426
<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi/17445	81	$4,2 \times 10^{-14}$	511-624
<i>Methanococcus jannaschii</i>	gi/1591146	40	$5,4 \times 10^{-10}$	178-312
		43		502-624

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	14
2	MCTVCGC--GTS	AIE	-GHTHEVGDDGH	GHH	H-HDGHHDH	DHDH	HRGDHHDHHAED	GSVHYSKGIAGV	HVP	GMSQERIIQVEK	DIL	86	
3	MCTVCGCSDGK	ASIE	HAHDHH-HDH	GHDH	HGHDGHHH	HCHGHD	DH--HHDHHA	GDA	GLLDCGANPAGQ	KIT	GMSSDRIIQVER	DIL	87
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-MATHSHPH-	-----	-----	-----	-----	-----	8
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
18	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	34
20	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	41
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
1	KANKRLADK	NRKLLN	KHGVVAFDFMGA	IGS	GKTLLEKLTIDN	LKD	K-YKTAACIAGD	VIAR	FDARMEKHGA	----	----	----	97
2	SKNDAYAAEN	RRHFE	RQGVAFALNFV	SSPGS	GKTSLLVRTIK	DLKD	R-LSISVIEGD	QOTS	NDAAIRIRETGA	----	----	----	169
3	GKNDRLAADN	RAFR	ADEVLAFLNLV	SSPCA	GKTSLLVRAVSE	LKD	S-FAIGVIEGD	QOTS	NDAAIRIRATGV	----	----	----	170
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	71
6	--SHTVBARPR	VRK	PGEPLRIGVG	GPVGS	GKTALVAALCR	QLRG	E-LSLAVLTND	IYTT	EDADFLRTH--	AVLE	DDRIRAFVQ	TGGCPHT	93
7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	72
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	71
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	72
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73
11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75
14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73
15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	69
16	--SNTVATMIN	KRNI	MRNYIKIGV	AGPVGA	GKTALIEKLTRE	IAS	K-YSVAVITND	IYTO	EDAEFLTKN--	SLLE	PERIMGVET	TGGCPHT	86
17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	82
18	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	83
19	KYTERBPPK	YKRNW	KERAFTVGI	GGPVGS	GKTALMLALCK	ALRD	Q-YSLAAVTND	IETK	EDTEFLVRN--	NALP	AERIRAEIT	TGGCPHA	121
20	KYTERBPPK	YKRNW	KERAFTVGI	GGPVGS	GKTALMLALCK	ALRD	Q-YSLAAVTND	IETK	EDTEFLVRN--	NALP	AERIRAEIT	TGGCLHA	128

Figura 14. Resultado do alinhamento das proteínas deduzidas para os clones NtGi2 (linha 20) e NtGi3 (linha 19), com sequências de proteínas homólogas armazenadas em banco de dados. Linhas 1 a 3 - Hidrogenases de: 1. *Methanococcus jannaschii*; 2. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* e 3. *Bradyrhizobium japonicum*. Linhas 4 a 18 - Proteínas acessórias da urease (UreG) de: 4. *Arabidopsis thaliana*; 5. *Bacillus pasteurii*; 6. *Mycobacterium tuberculosis*; 7. *Streptococcus salivarius*; 8. *Bacillus* sp. TB-90; 9. *Staphylococcus xylosus*; 10. *Ureaplasma urealyticum*; 11. *Klebsiella aerogenes*; 12. *E. coli*; 13. *Proteus mirabilis*; 14. *Synechocystis* sp; 15. *Helicobacter pylori*; 16. *Haemophilus influenzae*; 17. *Yersinia pseudotuberculosis* e 18. *Yersinia enterocolitica*.

```

181      195 196      210 211      225 226      240 241      255 256      270
1  ---LAHLVGHALEEDLN---LDEIDLLEFIE NVGNLICPADFDLGT HKRIVVISTTEGDDT IEKH PGIMKTAADLIV INKIDLA---174
2  ---AHMVGHAVEEDLA---PEPGSALEFIE NVGNLVCPAAFDLGE AHKVVVLSTTECEDK ELKY PDMFAAADLIV INKADILPH---246
3  ---AAMVGEYDR LP---WINGGLLEFIE NVGNLVCPAAFDLGE ACKIVVVFSTTECEDK ELKY PDMFAAADLIV INKIDLASV---247

4  ---LKNRE--DDLETLI---SAGDKI LRKGGPGITQADLIV INKTDLAAA-----33
5  AIREDA SMNFPAIEE LKNRE--DDLETLI---SAGDKI LRKGGPGITQADLIV INKTDLAAA-----98
6  AIREDDITANLDAIDE LMAA-HDALDLILVE SGGDNLAATFSPDLV DAQIEVIDVAGGDKV PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----173
7  AIREDA SMNFPAIEE LQERENHDLDFVIE SGGDNLAATFSPDLV DFTIYVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----153
8  AIREDA SMNFPAIEE LKER-HPDLELIFIE SGGDNLAATFSPDLV DFSIYVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----151
9  AIREDA SMNFPAIEE LKER-NDDIELIFIE SGGDNLAATFSPDLV DFSIYVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----152
10 AIREDA SMNFPAIEE MCDK-HPDLQLFIE SGGDNLAATFSPDLV DFSIYVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----153
11 AIREDA SMNLAIVEA LSEK-FGNLDLIFIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----155
12 AIREDA SMNLAIVEA LAIR-HKNLDLIFIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----155
13 AIREDA SMNLAIVEA LAMR-HKNLDLIFIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----155
14 AIREDA SMNLAIVEA LBAR-FMPLDMVIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----153
15 AIREDA SMNLAIVEA MBGRF-PNLELLIFIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----149
16 AIREDA SMNLAIVEA MVTRF-PDVELIFIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----166
17 AIREDA SMNLAIVEA MEERF-PESDLIMIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----163
18 AIREDA SMNLAIVEA MEERF-PDSNLMIE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----163
19 AIRGDISANLGALEE LHAKF--NSQILLVE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----208
20 AIREDISANLGALEE LHAKF--NSQILLVE SGGDNLAATFSPDLV DLTIVVIDVAQCEKI PRKGGPGITVYSDLIV VNKTDL-----202

271      285 286      300 301      315 316      330 331      345 346 360
1  ---VCAID IKKMENDAKRINPDA EVVLLSLKTMEGFDK VLEFIEKSVKEVK---221
2  ---LDFN TCFCIANALRVNPKI QTLTVSARTGEGMEA FYAWLEVSAAARRAIR SKVA-----299
3  ---LDFD LARTIEYARRVNPKI EVLTLTARTGEGFAA FYAWIR---KRMAT TPAAMTAAE 302

4  ---VCAID LSVMERDLSRLMEG HLSFAQVKHG-----62
5  ---LDE IIAWIKSDLLLEGKT NESASRV--123
6  LVCAD LAMVARDADAVRDGR PTVLQSLTEDPAASD VVAWVRSQLAADG-V 224
7  YVCAN LDRMREDTLHFRNED SFIFTNLNNDNVKE VEEWIRKNFLED-L 204
8  YVCAS LEVMERDTLAARGDK PYIFTNLKDEIGLAE VLEWIKTNALLYG-L ES-----204
9  YVCAS LERMAEDTKVFRGNR PFTFTNLKTDEGLDE VIEWIEQYVFLKG-L A-----204
10 YVCAN VEVMKADTLKSRGNK DFFVTNLKTDEGLKS VADXIEKRLQLAL-L EE-----206
11 YVCAS LEVMASTQRMGRDR PWTFTNLKQDGLST IIAFLEDKGMGLK--205
12 YVCAS LEVMEADTARMRPVK PYVFTNLKKVGLGT IIEFIIDKGMGLR--205
13 YVCAS LEVMEADTAKMRPVK PYVFTNLKEVGLGT IIDFIIDKGMGLR--205
14 YVCAS LGIMORDAKMRGEK PFVFTNLKTATGLST VVDFV-EHYLPTK-V LAS-----206
15 YVCAD LKVMEDDSKKIAAKS PLFLPNIRAKEGLDD VIAWIKRNALLED--199
16 YVCAD LSVMERDARRMRNGQ PFIFTNLMKKENLDG VIGWIEKYALLKN-V EEPASLVR-225
17 SWRVIP KSCAA IALIF-----187
18 YVCAS LDVMEADTKVVRGER PYILTNCCKTGQIEE LVDMIMRDFLFTH-V QPQGEHA--221
19 -----208
20 MYRWNSKERRSXHYT IRSFXXNFXXLECGH LGILXRA-----239

```

Continuação Figura 14.

Tabela 8. Sítios de regulação putativos presentes na sequência de aminoácidos deduzida para os clones **NtGi2** e **NtGi3**.

Sítios	Número encontrado			Número esperado			Intervalo de confiança (95%)		Sequências			Posição	
	NtGi2	NtGi3	NtGi2	NtGi3	NtGi2	NtGi3	NtGi2	NtGi3	NtGi2	NtGi3	NtGi2	NtGi3	NtGi3
<i>N-Glicosilação</i>	1	2	1,0564	0,7827	3	2							
<i>Fosforilação quinase-tirosina</i>	1	1	0,4013	0,3136	2	1							
<i>Sequência de adesão celular</i>	-	1	-	0,0690	-	1							
<i>Ligação ATP/GTP</i>	1	1	0,0182	0,0219	0	0							
<i>Fosforilação quinase-C</i>	4	2	3,1484	1,7338	6	4							
<i>Fosforilação quinase-caseína II</i>	3	4	2,7996	2,4653	6	5							
<i>Ministoilação</i>	5	4	3,2365	4,9390	6	9							
<i>Sinal C-terminal de microcorpos</i>	3	2	3,3496	3,0757	7	6							

ureG) necessários à incorporação do níquel na enzima. A deleção destes genes acessórios resulta na síntese de uma urease inativa, deficiente em níquel (Mulrooney & Hausinger, 1990; Lee et al., 1992). Foi determinado que *UreG* possui um sítio de ligação de nucleotídeo, sugerindo sua atuação na hidrólise de ATP para incorporação do íon metálico (Lee et al., 1992). Agrupamentos de genes codificando uma urease e suas proteínas acessórios, também foram identificados em *Rhizobium meliloti* (Miksch et al., 1994), *Providencia stuartii* (Mulrooney et al., 1988) e *Aspergillus nidulans* (McKey & Pateman, 1982).

Atividades de urease já foram identificadas em plantas (Dixon et al., 1975; Hine & Sprent, 1988; Torisky et al., 1994) e fungos (Crippa et al., 1987; Petruccioli & Federici, 1992; Ismail & Abdel-Sater, 1994; Mackay & Pateman, 1982), incluindo fungos ectomicorrízicos, constituindo-se em um parâmetro de identificação taxonômica destes (Hutchison, 1990). Estas enzimas são responsáveis pela degradação da uréia a amônio, passo intermediário no metabolismo da arginina. Além disso, estão presentes também em plantas leguminosas noduladas, as quais transportam nitrogênio na forma de ureídeos. O catabolismo de ureídeos produz uréia como intermediário (Tomas & Schrader, 1981). Na leguminosa arbórea *Cassia fasciculata* foram detectados elevados teores de ureídeos e altas atividades de ureases nos nódulos. É interessante notar que este teor foi maior em plantas que também foram colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares, quando comparado com nódulos de plantas não-colonizadas (Lynd & Ansman, 1994).

Tomas & Schrader (1981) indicam que o transporte de ureídeos em plantas não-nodulantes também ocorre e é dependente da forma de nitrogênio combinado utilizada pela planta. Este tipo de transporte resulta em economia de carbono pela planta, uma vez que a razão C:N dos ureídeos é bastante baixa (1:1), comparada a outros compostos orgânicos contendo N. Assim, embora não existam relatos de experimentos conduzidos para testar essa hipótese, é possível que

plantas não-nodulantes colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares, assim como plantas noduladas, sintetizam maiores quantidades de ureídeos, o que poderia explicar a indução de ureases nessas interações simbióticas.

Além do papel no metabolismo do nitrogênio em diversos organismos procariotos e eucariotos, existem relatos na literatura que sugerem o envolvimento de urease como fator de patogenicidade de diversos microrganismos patogênicos a seres humanos e animais (Mobley & Hausinger, 1989; Cole et al., 1996). Como resultado da atividade desta enzima nos rins, amônia é liberada, alcalinizando o meio e favorecendo a formação de cristais. Esse seria o possível mecanismo envolvido na formação de “pedras induzidas pela infecção” (“infection-induced stones”), um tipo de cálculo renal. Inoculação de *Proteus* em urina humana, ou tratamento com ureases de feijão resulta em alcalinização e formação de cristais. O processo é bloqueado quando adiciona-se ao meio inibidores de ureases (Mobley & Hausinger, 1989). Em casos de pielonefrite, ureases produzidas por espécies de *E. coli* contribuem significativamente para a danificação dos tecidos, inflamação e colonização das células pelo microrganismo (Mobley & Hausinger, 1989).

Como uma das regiões presente na proteína codificada pelos genes isolados no presente trabalho e que está ausente nas proteínas homólogas, corresponde a um sítio de fosforilação por quinase de tirosina, é possível especular-se que essas ureases poderiam ser fatores determinantes da infectividade dos fungos micorrízicos arbusculares. O envolvimento de quinase e fosfatase de tirosina no controle da resposta imune em macrófagos animais, já foi relatado (Clemens et al., 1991). Sugere-se que a desfosforilação decorrente da atuação de fosfatases de tirosina nos macrófagos poderia suprimir a ativação de processos envolvidos na defesa contra microrganismos patogênicos (Clemens et al., 1991).

Assim, em MAs, essas enzimas poderiam estar envolvidas no metabolismo de compostos nitrogenados ou ainda como fator de patogenicidade do fungo, facilitando o processo de colonização da planta.

4.8. Confirmação da expressão diferencial

4.8.1. Hibridização em “northern blots” com sonda radiativa ou sonda marcada com DIG-11-dUTP

Tanto a hibridização em “northern blots” com sonda radiativa, quanto com sonda marcada com DIG-11-dUTP não apresentaram resultados positivos, não sendo possível a detecção de sinal de hibridização nas autoradiografias das membranas. Em ambos os casos, a baixa abundância dos RNAs mensageiros correspondentes aos clones de interesse pode ter sido a causa dessa ausência de sinal de hibridização. Bertoli et al. (1995) reportam que a maioria dos RNA mensageiros (90%) são efetivamente produzidos em poucas cópias, estando presentes em quantidades tão baixas quanto 0,004% da totalidade dos RNAs mensageiros.

Quantificação de RNAs mensageiros por RT-PCR (“Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction”) pode ser uma alternativa à análise de “northern blots” e será utilizada futuramente para mais uma confirmação da expressão diferencial dos clones isolados.

5. CONCLUSÕES

- O “differential display” é uma técnica promissora para a clonagem de genes expressos diferencialmente em qualquer tecido ou célula de organismos eucariotos. No entanto, para a sua maior aplicabilidade, diversos problemas devem ser superados, tais como: a contaminação por DNA genômico, a falta de reprodutibilidade, a obtenção de falsos-positivos e, principalmente, a dificuldade na etapa de confirmação da expressão diferencial;

- A adaptação da técnica, utilizada no presente trabalho, foi eficiente para a clonagem de genes diferencialmente expressos durante a formação de micorriza arbuscular em plantas de fumo;

- Os cDNAs isolados no presente trabalho apresentam alta homologia em nível de nucleotídeos e aminoácidos com genes que codificam proteínas acessórias da urease;

- Os cDNAs isolados possuem um provável sítio único de fosforilação por quinase de tirosina que não está presente em outras proteínas acessórias da urease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER,D.; MÜLLER,H.; REICH,J.; RIEDEL,H.; AHRENKIEL,V.; WARTHOF,P.; STRAUSS,M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acid Research**, v.21, n.18, p.4272-4280, 1993.

BÉCARD,G. & PICHE,Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v.112, p.77, 1989.

BÉCARD,G.; DOUDS,D.D.; PFEFFER,P.E. Extensive hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.821-825, 1992.

BÉCARD,G.; TAYLOR,L.P.; DOUDS JUNIOR,D.D.; PFEFFER,P.E.; DONER,L.W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, n.2, p.252-258, 1995.

BEIJERSBERGEN,A. & HOOYKAAS,P.J.J. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. In: NESTER,E.W. & VERMA,D.P.S. **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. Vol. 2, 37-49.

BERTIOLI,D.J.; SCHLICHTER,U.H.A.; ADAMS,M.J.; BURROWS,P.R.; STEINBIB,H.; ANTONIW,J.F. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4520-4523, 1995.

- BLEE,K.A. & ANDERSON,A.J. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. **Plant Physiology**, v.110, p.675-688, 1996.
- BONFANTE-FASOLO,P.; TAMAGNONE,L.; PERETTO,R.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ,M.T.; MAZAU,D.; MOSINIAK,M.; VIAN,B. Immunocytochemical location of hydroxyproline rich glycoproteins at the interface between a mycorrhizal fungus and its host plants. **Protoplasma**, v.165, p.127-138, 1991.
- BONFANTE-FASOLO,P. & PEROTTO,S. Plants and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: VERMA,D.P.S. **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications**. London: CRC Press, 1992. p.445-470.
- BONFANTE,P. & PEROTTO,S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, v.130, p.3-21, 1995.
- BRADBURY,S.M.; PETERSON,R.L.; BOWLEY,S.R. Further evidence for a correlation between nodulation genotypes in alfafa (*Medicago sativa* L.) and mycorrhiza formation. **New Phytologist**, v.124, p.665-673, 1993.
- BURGESS,T.; LAURENT,P.; DELL,B.; MALAJCZUK,N.; MARTIN,F. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, v.195, p.408-417, 1995.
- CARR,J. & KLESSIG,D.F. The pathogenesis-related proteins of plants. In: SETLOW,J.K. **Genetic Engineering-Principles and Methods**, Plenum Press, 1990, vol. II, p. 65-109.
- CLEMENS,J.C.; GUAN,K.; BLISKA,J.B.; FALKOW,S.; DIXON,J.E. Microbial pathogenesis and tyrosine dephosphorylation: surprising "bedfellows". **Molecular Microbiology**, v.5, n.11, p.2617-2620, 1991.
- COLE,G.T.; HOWARD,D.H.; MILLER,J.D. Biochemistry of enzymatic pathogenicity factors. **The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Volume VI: Human**

and animal relationships, p.31-65, 1996. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1996-97/

CRIPPA,A.; BRUNO,E.; MANGIAROTTI,A.M.; CARETTA,G. Extracellular enzymatic activities of 32 fungal species. **Boletim Micologico**, v.3, n.2, p.129-134, 1987. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1987-89/

DELP,G.; SMITH,S.E.; BARKER,S.J. Two differential display products from the VA fungus *G. intraradices*: one contains a homeobox; the other shows homology to a human thyroid receptor-interacting protein. In: 8th INTERNATIONAL CONGRESS: MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, **Abstract Book**. Knoxville, TN, USA, 1996.

DÉNARIÉ,J.; DEBELLÉ,F.; ROSENBERG,C. Signaling and host range variation in nodulation. **Annu. Rev. Microbiol.** v.46, p.497-531, 1992.

DIXON,N.E.; GAZZOLA,C.; WATTERS,J.J.; BLAKELEY,R.L.; ZERNER,B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? **Journal of the American Chemical Society**, v.97, n.14, p.4131-4133, 1975.

DUC,G.; 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.

DUMAS,E.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; GIANINAZZI,S. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.29, p.111-114, 1989.

EBEL,J. Phytoalexins synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.24, p.235-264, 1986.

FRANKEN,P. & GNÄDINGER,F. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense-related genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, n. 5, p.612-620, 1994.

FRÜHLING,M.; ROUSSEL,H.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; PÜHLER,A.; PERLICK,A.M. The *Vicia faba* leghemoglobin gene VfLb29 is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.1, 1997.

GARCIA-GARRIDO,J.M.; GARCIA-ROMERA,I.; OCAMPO,J.A. Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. And Trappe. **New Phytologist**, v.121, p.221-226, 1992.

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

GIANINAZZI-PEARSON,V.; DUMAS-GAUDOT,E.; GOLLOTTE,A.; TAHIRI-ALAOUI,A.; GIANINAZZI,S. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.133, p.45-47, 1996.

GIANINAZZI-PEARSON,V. & GIANINAZZI,S. Cellular and genetical aspects of interactions between hosts and fungal symbionts in mycorrhizae. **Genome**, v.31, p.336-341, 1989.

GIANINAZZI-PEARSON,V.; TAHIRI-ALAOUI,A.; ANTONIW,J.F.; GIANINAZZI,S.; DUMAS,E. Weak expression of the pathogenesis related PR-b 1 gene and localisation of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. **Endocytobiology and Cell Research**, v.8, p.177-185, 1990.

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

GIOVANNETTI,M.; AVIO,L.; SBRANA,C.; CITERNESI,A.S. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, v.123, p.115-122, 1993.

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

GOLLOTTE,A.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; GIOVANNETTI,M.; SBRANA,C.; AVIO,L.; GIANINAZZI,S. Cellular and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a “locus *a*” myc- mutant of *Pisum sativum* L. **Planta**, v.191, p.112-122, 1993.

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

HARLEY,J.L. & SMITH,S.E. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press. London, 1983. 483p.

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

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, n. 5, p.643-654, 1993.

HARRISON,M.J. & VAN BUUREN,M.L. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, v.378, p.626-629, Dec., 1995.

HEPPER,C.M. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In: POWELL,C.L. & BAGYARAJ,D.J. **VA Mycorrhiza**. Florida: CRC Press, 1984. chapter 5, 95-112.

HILBERT,J.L. & MARTIN,F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. **New Phytologist**, v.110, p.339-346, 1988.

HINE, J.C. & SPRENT, J.I. Growth of *Phaseolus vulgaris* on various nitrogen sources: the importance of urease. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.208, p.1505-1512, 1988.

HUTCHISON, L.J. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. **Canadian Journal of Botany**, v.68, n.7, p.1522-1530, 1990. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1990-91/

ISMAIL, M.A. & ABDEL-SATER, M.A. Mycoflora inhabiting water closet environments. **Mycoses**, v.37, n.1-2, p.53-57, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993-94/

KOIDE, R.T. & LIM, M. On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.114, p.59-64, 1990.

KOIDE, R.T. & SCHREINER, R.P. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.557-581, 1992.

LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M.; DIXON, R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. **Cell**, v.56, p.215-224, 1989.

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, n.1, p.75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Can. J. Bot.**, v.73, (Suppl. 1), S533-S540, 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, n.3, p.531-538, 1996.

- LAMBAIS,M.R. Expression of plant defense genes during the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Austin, 1993. 150p. Dissertation (Ph.D) - University of Texas.
- LAMBAIS,M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA,J.O. (Ed.) **Avanços em Fundamentos e Aplicações de Micorrizas**. Lavras: UFLA/DCS e DCF, 1996. p.5-38. /no prelo/
- LEE,M.H.; MULROONEY,S.B.; RENNER,M.J.; MARKOWICZ,Y.; HAUSINGER,R.P. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of *ureD*, and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF* and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4324-4330, 1992.
- LIANG,P. & PARDEE,A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.
- LIANG,P.; AVERBOUKH,L.; KEYOMARSI,K.; SAGER,R.; PARDEE,L. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer *versus* mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v.52, p.6966-6968, 1992.
- LIANG,P.; AVERBOUKH,L.; PARDEE,A.B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acid Research**, v.21, n. 14, p.3269-3275, 1993.
- LIANG,P.; ZHU,W.; ZHANG,X.; GUO,X.; O'CONNEL,R.P.; AVERBOUKH,L.; WANG,F.; PARDEE,A.B. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. **Nucleic Acid Research**, v.22, p.5763-5764, 1994.
- LYND,J.Q. & ANSMAN,T.R. Lichen mycobionts of mycorrhizal symbiosis with nitrogen-fixation of Showy Partridge Pea. **Journal of Plant Nutrition**, v.17, n.2-3, p.445-459, 1994. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993-94/.
- MACKAY,E.M. & PATEMAN,J.A. The regulation of urease activity in *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Genetics**, v.20, n.7-8, p.763-776, 1982.

- MANTELL,S.; MATTHEWS,J.A.; MCKEE,R.A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Trad. de J.L. de Azevedo, M.L.R. Aguiar-Perecin e N.A. Vello. Ribeirão Preto: SBG, 1994. cap. 3, p.39-70: Clonagem de genes de plantas.
- MIKSCH,G.; ARNOLD,W.; LENTZSCH,P.; PRIEFER,U.B.; PÜHLER,A. A 4.6kb DNA region of *Rhizobium meliloti* involved in determining urease and hydrogenase activities carries the structural genes for urease (*ureA*, *ureB*, *ureC*) interrupted by other open reading frames. **Mol. Gen. Genet.**, v.242, p.539-550, 1994.
- MOBLEY,H.L.T. & HAUSINGER,R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v.53, n.1, p.85-108, 1989.
- MULROONEY,S.B. & HAUSINGER,R.P. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.10, p.5837-5843, 1990.
- MULROONEY,S.B.; LYNCH,M.J.; MOBLEY,H.L.T.; HAUSINGER,R.P. Purification, characterization, and genetic organization of recombinant *Providencia stuartii* urease expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.2202-2207, 1988.
- MURPHY,P.J.; LANGRIDGE,P.; SMITH,S.E. Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v.135, p.291-301, 1997.
- OH,B.J.; BALINT,D.E.; GIOVANNONI,J.J. A modified procedure for PCR-based differential display and demonstration of use in plants for isolation of genes related to fruit ripening. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.13, p.70-81, 1995.
- PEROTTO,S.; BREWIN,N.J.; BONFANTE,P. Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria:

- immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, n.1, p.91-98, 1994.
- PETERS,N.K. & VERMA,D.P.S. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.3, p.48, 1990.
- PETRUCCIOLI,M. & FEDERICI,R.G. A note on the production of extracellular hydrolitic enzymes by yeast-like fungi and related microorganisms. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.42, n.1, p.81-86, 1992. /Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993-94/
- PHILLIPS,J.M. & HAYMAN,D.S. Improved procedures for clearing roots, and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v.55, p.158-162, 1970.
- POIRIER,G.M.C.; PYATI,J.; WAN,J.S.; ERLANDER,M.G. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.4, p.913-914, 1997.
- ROSENDAHL,S. Influence of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Glomaceae) on the activity of specific enzymes in the root system of *Cucumis sativus* L. **Plant and Soil**, v.144, p.219-226, 1992.
- SAGER,R.; ANISOWICZ,A.; NEVEU,M.; LIANG,P.; SOTIROPOULOU,G. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. **The FASEB Journal**, v.7, p.964-970, 1993.
- SAMBROOK,J.; FRITSCH,E.F.; MANIATIS,T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 1989. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- SANGER,F.; NICKLEN,S.; COULSON,A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.

- SANGUINETTI,C.J.; DIAS NETO,E.; SIMPSON,A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **BioTechniques**, v.17, p.915-919, 1994.
- SARRUGE,J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SCHREINER,R.P. & KOIDE,R.T. Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. **New Phytologist**, v.123, p.99-105, 1993.
- SHARMA,Y.K. & DAVIS,K.R. Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. **Plant Molecular Biology**, v.29, p.91-98, 1995.
- SIMONEAU,P.; LOUISY-LOUIS,N.; PLENCHETTE,C.; STRULLU,D.G. Accumulation of new polypeptides in RiT-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.6, p.1810-1813, 1994.
- SIQUEIRA,J.O.; SAFIR,G.R.; NAIR,M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v.118, p.87-93, 1991.
- SMITH,S.E. & GIANINAZZI-PEARSON,V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.39, p.221-244, 1988.
- SMITH,S.E. & SMITH,F.A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. **New Phytologist**, v.114, p.1-38, 1990.
- SMITH,S.E.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; KOIDE,R.; CAIRNEY,J.W.G. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. **Plant and Soil**, v.159, p.103-113, 1994.

- SPANU,P.; BOLLER,T.;LUDWIG,A.; WIEMKEN, A.; FACCIO,A.; BONFANTE-FASOLO,P. Chitinase in mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, v.177, p.447-455, 1989.
- TAGU,D.; PHYTON,M.; CRÉTIN,C.; MARTIN,F. Cloning symbiosis-related cDNAs from eucalypt ectomycorrhiza by PCR-assisted differential screening. **New Phytologist**, v.125, p.339-343, 1993.
- THOMAS,R.J. & SCHRADER,L.E. Ureid metabolism in higher plants. **Phytochemistry**, v.20, p.361-371, 1981.
- TORISKY,R.S.; GRIFFIN,J.D.; YENOFISKY,R.L.; POLACCO,J.C. A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Mol. Gen. Genet.**, v.242, p.404-414, 1994.
- VOLPIN,H.; ELKIND,Y.; OKON,Y.; KAPULNIK,Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfafa roots. **Plant Physiology**, v.104, p.683-689, 1994.
- VÖGELI-LANGE,R.; BÜRCKERT,N.; BOLLER,T. Search for mycorrhiza-specific symbiosis genes by improved mRNA differential display. In: 8th INTERNATIONAL CONGRESS: MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, **Abstract Book**. Knoxville, TN, USA, July, 1996a.
- VÖGELI-LANGE,R.; BÜRCKERT,N.; BOLLER,T. Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. **Nucleic Acid Research**, v.24, n.7, p.1385-1386, 1996b.
- WILKINSON,J.Q.; LANAHAN,M.B.; CONNER,T.W.; KLEE,H.J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.1097-1108, 1995.
- WYSS,P.; BONFANTE,P. Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. **Mycological Research**, v.97, n.11, p.1351-1357, 1993.

WYSS,P.; MELLOR,R.B.; WIEMKEN,A. Mutants of soybean (*Glycine max*) unable to suppress nodulation in the presence of nitrate retain the ability to suppress mycorrhization in the presence of phosphate. **J. Plant Physiol.**, 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.

ZHANG,H.; ZHANG,R.; LIANG,P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.12, p.2454-2455, 1996.

ZHAO,S.; OOI,S.L.; PARDEE,A.B. New primer strategy improves precision of differential display. **BioTechniques**, v.18, n.5, p.842-850, 1995.

APÊNDICE

```

Clone NtGi1 .input.4358 [Unknown form], frame+3, 244 bases, D48 checksum.
XWSPRGGGRSSPLRQT**LLRQCLKIISTRPPSTQYQNDLRNSNAVLHLSKYCRSTLPHTSI PVHDSQICPNNFS*ISFIND*KI*LCNAWTSFPWNFITTRYINNIDNIIR*FS
RIIGS*IIATTFNK*YLRIFKFSM*FFESTQISRIFYSDSSMWTSTSFYCTNTFCWQSIIITN*EFCIFPGENIVCYGCNRLVIS*SFA*CQH*CCFPRSNRNSNSDSKSSFFPITFFVF
XWLSFXIX
>/tmp/outseq.input.4358 [Unknown form], frame+2, 245 bases, 12EA checksum.
KXBSTRWRPL*PTSTMMITSTMLKNYQHQTSPKHSISIQRPAAEFQRRSSLE*ILSVHSPSYFHEPCRLPNLPQQFQLNQFY**LKDLIV*CLDLLSEFYHHLHQ*HR*YNPLIL
ENNWQLNRYRHHFQVIFEN*I*HVILREHPN*QIYLL**QHVDIHQFLLHEYVLLAKHYELRILYLLW*KYRLLRLQ*S IDLLKLCIMPMLMFSQIQQELQFRQ*KLFLSNYVFRI
XVALFXYYX
>/tmp/outseq.input.4358 [Unknown form], frame+1, 245 bases, 1BD4 checksum.
QXGVHAAALAHFDKDDYFDNA*KLSAPDALQALNINSTTCGIPTPFFT*VNI VGPLSLILRASLSTTPKSAPTISAKSVLLMIKRSDCVMPGPPFLGILSPPATSIT*II*SANS
RE*LAAKLSPPLSTSNi*ELNLACNSSRAPKLADISSLIAACGHPVSIARIRSAGKALLRTKNSVSSLVKISFVTAABEY*SLKALHNANINAVFPDPTGPTIPTVKALSFQLRFSY
XGGSLSVXX
>/tmp/outseq.input.4358 [Unknown form], frame-1, 245 bases, 15E2 checksum.
XXIXKESHXNTKNVIGKKELLLEFLDLGKQH*CWYAKL*EINTLLQP*QTIFSPKKIQNS*FVIMLCQONVVFQ*KLVDVHMLLSEKIYLLIWNLSKNYMLNLILKYLLKVV
AII*LPILLEN*RIILSMLLM*RVVTKFQGEVQALHNQIF*SLIKLI*KLKLGQIWEWGTMLVK*GRVDRQYLLK*RTALEFRRLN*Y*VLGRLVLIIIPKHCNRNHHVCRSGLE
RPPPRGLXF
>/tmp/outseq.input.4358 [Unknown form], frame-2, 245 bases, 8C2 checksum.
XXYXKRATXIRKT*LERKSFYCRNWSSCIWENSINVGIMQSFKRSILYCSRNKRYFHQRRYRILSS**CFASRTYSCNRNWMSTCCYQRRYIC*FGCSRITC*I*FSNITC*KW
R*FSCQLFSRISGLYLCY*CSGW*NSKERRSRHYTIRSFNH**N*FS*NCWGRFSGRGQCS*NEGEWTDNIYSSEERRWNSAGR*IDIECLBGVNC**FLSIVEVIIMFVEVGS
GRHRVDSXL
>/tmp/outseq.input.4358 [Unknown form], frame-3, 244 bases, 1196 checksum.
XYTEREPKRYEKRNNKERAFTVIGIGPVGSGKTALMLALCKALRDQYSIAAVTNDIPTKEDTEFLVRNNALPAERIRATETGGCPHAAIREDISANLGALELHAKFNSQILLVESGG
DNLAANYSRRLADYIYIVDVAGGDKIPRKGPGGITQSDLLIINKTDIAEIVGADLGVDVDRDKMRSGPTIFTQVKNVGIPQVVELILSAWRASGADNP*ALSK*SSCLS KWARA
AATAWTPX

```

```

Clone NtGi2, frame+3, 247 bases, 90D checksum.
NWTFRGGGRSSPLRQOEVLMDMGMIMV*ENMGTLMMN**IIPVNIPKESHQNTKNVIGKKELLLEFLDLGKQH*CWYAKL*EINTLLQP*QTIFSPKKIQNS*FVIMLCQONV
VQ*KLVDVVMMLSEKIYLLIWNLSKNYMLNLILKYLLKVVAAI*LPILLEN*RIILSMVRLYHFIXIN*LYTS*AXLXILHX*CTGGDKIPRKGPGGITQSDLLXNKTDLXEXC
LGAIWESXTGL
>Clone NtGi2, frame+2, 247 bases, 15B3 checksum.
KLDSTRWRPL*PTSTTGSAGHGHDHGVGEHGHTEQLDNPQKYTEREPKRYEKRNNKERAFTVIGIGPVGSGKTALMLALCKALRDQYSIAAVTNDIPTKEDTEFLVRNNALPAERI
RAIRTGCCLEHAIREDISANLGALELHAKFNSQILLVESGGDNLAANYSRRLADYIYVGTIPFHXHKLIN*LSXPXYFTXLMYRW**NSKERRSRHYTIRSFXX**N*FX*XL
FGHLGILXRA
>Clone NtGi2, frame+1, 248 bases, A44 checksum.
QTGLHAAALAHFDNRKCSWTWA*SWCRRTWAHS*TIR*SR*YRKRATKIRKT*LERKSFYCRNWRSWCIWENSINVGIMQSFKRSILYCSRNKRYFHQRRYRILSS**CFASRTY
SCNRNWMSTCCYQRRYIC*FGCSRITC*I*FSNITC*KWWR*FSCQLFSRISGLYLLW*DYTISS*IN*LIVKLSXXLYIXIDVPVVIKFGQGEVXALHNQIFXSKIKLIXLXI
VWGPFNGNPXQGS
>Clone NtGi2, frame-1, 248 bases, 1556 checksum.
XALXRIKPKPNPNQXNQYXXXKDILV*CXDLLSEFYHHRYNXVVK*XXGXLNKLINL*X*NGIVLP*II*SANSRE*LAAKLSPPLSTSNi*ELNLACNSSRAPKLADISSLI
AACRHPVSIARIRSAGKALLRTKNSVSSLVKISFVTAABEY*SLKALHNANINAVFPDPTGPPIPTVKALSFQLRFSYFGGSLSVYLPGLSNCS*VPCPSPT*SCPCP*ALPVVEV
G*SGRHRVSSL
>Clone NtGi2, frame-2, 247 bases, 5ED checksum.
EPCXGPGNGPQTXFX*ISFIIX*KI*LCNAXTSFPWNFITGTISXM*NX*XSLTIS*LIYXDEM*SYHR*YNPLILENNWQLNRYRHHFQVIFEN*I*HVILREHPN*QIYLL**
QHVDIHQFLLHEYVLLAKHYELRILYLLW*KYRLLRLQ*SIDLLKLCIMPMLMFSQIQQDLQFRQ*KLFLSNYVFRILVALFRYIYRDYLVHBCAHVLLHHDHAHVHVEHFLLSKW
ARAAATAWSPV
>Clone NtGi2, frame-3, 247 bases, 1DD checksum.
SPVQDSQMAPKQXSKSVLLXXKRSDCVMPGPPFLGILSPPVHQ*XCXIXXRXA*L*VN*FMXMKWYSLTIDNIIR*FSRIIGS*IIATTFNK*YLRIFKFSM*FFESTQISRIFYSDS
SM*TSSTSFYCTNTFCWQSIIITN*EFCIFPGENIVCYGCNRLVIS*SFA*CQH*CCFPRSNRNSNSDSKSSFFPITFFVFWWLSFGIFTGII*LFMSVPMFSYTMIMPMSMSTSCCRSG
LERPPRGVQF

```

```

Clone NtGi3.input.22832 [Unknown form], frame+3, 208 bases, 1FBB checksum.
QICPNNS*ISFIND*KI*LCNAWTSFPWNFITTRYINNIDNIIR*FSRIIGS*IIATTLNK*YLRIFKFSM*FFESTQISRIFYSDSSMWTSTSFYCTNTFCWQSIIITN*EFCIFPG
NIVCYGCNRLVIS*SFA*CQH*CCFPRSNRNSNSDSKSSFFPITFFVFWWLSFGIFTGII*LFMSVPMFSYTMIMPMSMXHLLSXWGS
&gt;/tmp/outseq.input.22832 [Unknown form], frame+2, 209 bases, 2453 checksum.
PNLPQQFQLNQFY**LKDLIV*CLDLLSEFYHHLHQ*HR*YNPLILENNWQLNRYRHHFQVIFEN*I*HAILREHPN*QIYLL**QHVDIHQFLLHEYVLLAKHYELRILYLLW*
KYRLLRLQ*SIDLLKLCIMPMLMFSQIQQDLQFRQ*KLFLSNYVFRILVALFRYIYRDYLVHBCAHVLLHHDHAHVHXTLPVVGXGRIP
&gt;/tmp/outseq.input.22832 [Unknown form], frame+1, 209 bases, 1E9D checksum.
PKSAPTISAKSVLLMIKRSDCVMPGPPFLGILSPPATSIT*II*SANSRE*LAAKLSPPLSTSNi*ELNLACNSSRAPKLADISLIAACGHPVSIARIRSAGKALLRTKNSVSSLV
KISFVTAABEY*SLKALHNANINAVFPDPTGPPIPTVKALSFQLRFSYFGGSLSVYLPGLSNCS*VPCPSPT*SCPCPXTSCCPXGADP
&gt;/tmp/outseq.input.22832 [Unknown form], frame-1, 209 bases, 17F5 checksum.
GDPPXLDNRKCMMDGMIMV*ENMGTLMMN**IIPVNIPKESHQNTKNVIGKKELLLEFLDLGKQH*CWYAKL*EINTLLQP*QTIFSPKKIQNS*FVIMLCQONVVFQ*KLVD
VHMLLSEKIYLLIWNLSKNYMLNLILKYLLRVAAI*LPILLEN*RIILSMLLM*RVVTKFQGEVQALHNQIF*SLIKLI*KLKLGQIW
&gt;/tmp/outseq.input.22832 [Unknown form], frame-2, 209 bases, 193C checksum.
GIRPXWTTGSVXWTA*SWCRRTWAHS*TIR*SR*YRKRATKIRKT*LERKSFYCRNWRSWCIWENSINVGIMQSFKRSILYCSRNKRYFHQRRYRILSS**CFASRTYSCNRNWM
STCCYQRRYIC*FGCSRITC*I*FSNITC*EWWR*FSCQLFSRISGLYLCY*CSGW*QNSKERRSRHYTIRSFNH**N*FS*NCWGRFG
&gt;/tmp/outseq.input.22832 [Unknown form], frame-3, 208 bases, 18EF checksum.
GSAPXGQGVFHHGHGHGVGEHGHTEQLDNPQKYTEREPKRYEKRNNKERAFTVIGIGPVGSGKTALMLALCKALRDQYSIAAVTNDIPTKEDTEFLVRNNALPAERIRATETGGC
PHAAIRGDISANLGALELHAKFNSQILLVESGGDNLAANYSRRLADYIYIVDVAGGDKIPRKGPGGITQSDLLIINKTDIAETVAGDL

```

Apêndice 1. Seis possíveis quadros de leitura para os clones NtGi1, NtGi2 e NtGi3. Os quadros de leitura corretos estão achurados.

AseI MflI
 AsnI XhoII
 PshBI BglII
 CCCCCAATCTGCCCAACAATTCAGCTAAATCAGTTTTATTAATGATTAAAAGATCTGATTGTGTAATG Pares de bases
 GGGGTTTAGACGGGGTTGTTAAAGTCGATTTAGTCAAAATAATTACTAATTTCTAGACTAACACATTAC 1 a 70
 VspI BstX2I
 BstYI
 StyI ApoI
 BssTlI
 Eco130I
 CCTGGACCTCCTTTCTTGGAAATTTTGTCAACACCCGCTACATCAATAACATAGATAATATAATCCGCTA Pares de bases
 GGACCTGGAGGAAAGAACCTTAAACAGTGGTGGGCGATGTAGTTATTGTATCTATTATATTAGGCGAT 71 a 140
 EcoT14I
 ErhIacsI
 Sfr274IAvaI ApoI
 XhoI BcoI
 BsoBI
 SspI
 ATTCTCGAGAATAATTGGCAGCTAAATTATCGCCACCACTCTCAACAAGTAATATTTGAGAATTAAATTT Pares de bases
 TAAGAGCTCTTATTAACCGTCGATTTAATAGCGTGGTGAGAGTTGTTTCATTATAAACTCTTAATTTAAA 141 a 210
 Eco88I
 Paer7IAma87I AcsI
 BmyI NspI
 BbuI BsiHKA
 NspI Bsp1286IAlw21I
 AGCATGCAATTCTTCGAGAGCACCCAAATTAGCAGATATATCTCTCTGATAGCAGCATGTGGACATCCA Pares de bases
 TCGTACGTTAAGAAGCTCTCGTGGGTTTAATCGTCTATATAGAGGAGACTATCGTCGTACACCTGTAGGT 211 a 280
 PaeI SduI AspHI BseRI
 SphI Bbv12I
 ApoI
 EcoRI
 CCAGTTTCTATTGCACGAATACGTTCTGCTGGCAAAGCATTATTACGAACTAAGAATTCTGTATCTTCTT Pares de bases
 GGTCAAAGATAACGTGCTTATGCAAGACGACCGTTTCGTAATAATGCTTGATTCTTAAGACATAGAAGAA 281 a 350
 Asp700I
 XmnI AcsI
 VspI
 HindIII
 TGGTGAATATATCGTTTGTACGGCTGCAATAGAGTATTGATCTCTTAAAGCTTTGCATAATGCCAACAT Pares de bases
 ACCACTTTTATAGCAAACAATGCCGACGTTATCTCATACTAGAGAATTTTCGAAACGTATTACGGTTGTA 351 a 420
 BstX2I DraII
 BstYI EcoO109I
 TAATGCTGTTTTCCAGATCCAACAGGACCTCCAATTCCGACAGTAAAAGCTCTTTCTTTCCAATTACGT Pares de bases
 ATTACGACAAAAGGGTCTAGGTTGCTCGGAGTTAAGGCTGTCATTTTCGAGAAAGAAAGGTTAATGCA 421 a 490
 MflI PpuMI
 XhoII Psp5II
 RcaI MslI
 BmyI
 Bsp1286I
 TTTTCGTATTTTGGTGGCTCTCTTTCGGTATATTTACCGGGATTATCTAATTGTTTCATGAGTGTGCCCAT Pares de bases
 AAAAGCATAAAACCGAGAGAAAGCCATATAAATGGCCCTAATAGATTAAACAGTACTCACACGGGTA 491 a 560
 SduI
 BspHI
 Ksp22I XhoII BamHI
 MslI BstI
 MslI BstX2I
 GTTCTCCTACACCATGATCATGCCCATGTCCATGAACACTTCCTGTTGTCCAATGGGGCGGATCCCC Pares de bases
 CAAGAGGATGTGGTACTAGTACGGGTACGGTACTTGTGAAGGACAACAGGTTACCCCGCCTAGGGG 561 a 627
 BclI BstYI
 FbaI MflI

Apêndice 2. Análise de restrição para o clone NtGi3.

Enzima	Posições dos sítios de restrição	Sequência reconhecida
AcsI	90 205 334	r/aatty
Alw21I	232	gwgw/c
Ama87I	144	c/ycgrg
ApoI	90 205 334	r/aatty
AseI	41 420	at/taat
AsnI	41 420	at/taat
Asp700I	301	gaann/nnttc
AspHI	232	gwgw/c
AvaI	144	c/ycgrg
BamHI	620	g/gatcc
BbuI	216	gcatg/c
Bbv12I	232	gwgw/c
BclI	575	t/gatca
BcoI	144	c/ycgrg
BglII	53	a/gatct
BmyI	232 557	gdgch/c
BseRI	257	gaggag
BsiHKA I	232	gwgw/c
BsoBI	144	c/ycgrg
Bsp1286I	232 557	gdgch/c
BspHI	545	t/catga
BssT1I	85	c/cwggg
BstI	620	g/gatcc
BstX2I	53 436 620	r/gatcy
BstYI	53 436 620	r/gatcy
DraII	446	rg/gnccy
Eco130I	85	c/cwggg
Eco88I	144	c/ycgrg
EcoO109I	446	rg/gnccy
EcoRI	334	g/aattc
EcoT14I	85	c/cwggg
ErhI	85	c/cwggg
FbaI	575	t/gatca
HindIII	399	a/agctt
Ksp22I	575	t/gatca
MflI	53 436 620	r/gatcy
MslI	550 577 589	caynn/nnrtg
NspI	216 270	rcatg/y
PaeI	216	gcatg/c
PaeR7I	144	c/tcgag
PpuMI	446	rg/gwccy
PshBI	41 420	at/taat
Psp5II	446	rg/gwccy
RcaI	545	t/catga
SduI	232 557	gdgch/c
Sfr274I	144	c/tcgag
SphI	216	gcatg/c
SspI	193	aat/att
StyI	85	c/cwggg
VspI	41 420	at/taat
XhoI	144	c/tcgag
XhoII	53 436 620	r/gatcy
XmnI	301	gaann/nnttc

Continuação Apêndice 2.