UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAUL SANTIN ALMEIDA

**Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose
com micorriza arbuscular**

Piracicaba

2007

RAUL SANTIN ALMEIDA

**Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da
cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) durante a simbiose
com micorriza arbuscular**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba-SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Almeida, Raul Santin

Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose com micorriza arbuscular / Raul Santin Almeida; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. -- Piracicaba, 2007.
187 p. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Expressão gênica 2. Fósforo 3. Micorrizas arbusculares
4. qPCR 5. Sacarose I. Título

CDU 549.22:633.61

ALMEIDA, R. S. Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose com micorrizas arbusculares. 2007. 187 F. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ERRATA

Pág.	Linha	Onde se lê:	Leia-se:
Resumo			
9	1	de fósforo (Pi)	de fósforo inorgânico (Pi)
Abstract			
11	1	low soil phosphorus (Pi)	low soil inorganic phosphorus (Pi)
12	11	phosphorus acquisition and leve,	phosphorus acquisition and use,
12	13	shoots were harvest	shoots were harvested
12	15	in mycorrhizedl or non-mycorrhizedl	in mycorrhized or non-mycorrhized
12	21	non-mycorrhizedl plants.	non-mycorrhized plants.
12	24	leaves from mycorrhizd	leaves from mycorrhized...
12	25	photosynthetic rate but withut	photosynthetic rate but without...
12	28	is easier... refernce gene.	is easier.... reference gene.
13	9	expressed in mycorrhizedl	expressed in mycorrhized
29	10	os compostos exsudatos	os compostos exsudados
29	24	Cluster roots (ou proteoid roots)...	Raízes proteóides
35	9	indicaram que estes não essências	indicaram que estes não seriam essenciais
35	14	vias de sinalização na plantas que ativam	vias de sinalização que ativam respostas de defesa na planta,
36	3	os interesses na descubra mecanismos	os interesses em descobrir mecanismos
46	7	citoplasma da planta	citoplasma de células da folha
51	16	estéreocóspico,	estereoscópico,
54	15	pacote estatístico SAS,	pacote estatístico SAS (SAS,1989),
54	26	médias de Tukey.	médias de Tukey (SAS, 1989).
57	13	A folha é considerada com bom indicadora	A folha é considerada como um bom indicador
60	13	que a +3 (sem nervura central) de referência.	que a folha +3 de referência (sem nervura central).
79	1	começaram o experimento com menor valor de MS total,	tinham no início (14 dpi) o menor valor de MS total,
81	4	Para o P a RER média do tratamento tratadas	Para o P, a RER média do tratamento
81	23	o que ser benéfico,	o que pode ser benéfico,
87	15	concentração de ATR	concentração de açúcares redutores totais (ATR)
91	Fig. 7	Sac (pmoles)	Sac (pmoles mg ⁻¹)
98	6	housekeeping genes have being	housekeeping genes have been
100	21	otimização do agrícola do fósforo	otimização do uso agrícola do fósforo
127	27	utilizando randômico e de <i>bootstrap</i>	utilizando reamostragem <i>bootstrap</i>
136	11	código de TC do bando	código de TC do banco
Referências			
180.	Scheiger P, Jakobsen I. Direct measurement of phosphorus uptake by native arbuscular mycorrhizal fungi with field-gorwn winter wheat. Agron J (Madison) 2000;91:998-1002. (citado na página 166)		
192.	Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA and Harrison MA. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Cell (Rockville) 2003;15:2106–2123. (citado na página 120, linhas 9 e 13)		

DEDICATÓRIA

Brindo à casa

Brindo à vida

Aos meus pais,

a minha Família,

com todo meu Amor e sempre.

“O Mundo de Deus é grande

Cabe numa mão fechada

O pouco com Deus é muito

O muito sem Deus é nada...”

UMA VEZ

*“Uma vez, perguntei a Seu Pastinha
O que era a capoeira
E ele, mestre velho respeitado,
Ficou um tempo calado,
Revirando a sua alma
Depois respondeu com calma,
Em forma de ladainha:
A capoeira
É um jogo, é um brinquedo,
É se respeitar o medo,
É dosar bem a coragem
É uma luta,
É manha de mandingueiro,
É o vento no veleiro,
Um lamento na senzala
É um berimbau bem tocado,
É um corpo arrepiado,
Um sorriso de menininho
A capoeira
É o vôo de um passarinho,
O bote da cobra coral...
Sentir na boca
Todo o gosto do perigo,
É sorrir para o inimigo
E apertar a sua mão
A capoeeeeira
É o grito de Zumbi
Ecoando no quilombo,
É se levantar do tombo
Antes de chegar ao chão
É o ódio,
É a esperança que nasce,
Um tapa sutil na face
Que foi arder no coração
Enfim,
É aceitar o desafio
Com vontade de lutar
A capoeira
É um barco pequenino
Solto nas ondas do mar...”*

(Mestre Tony Vargas)

*“the living together of differently named organisms...”
... independent on the outcome of the interaction.”
“symbiosis”*

by De Bary, its original definition.

*“.....Jack Harley would have said, “it does not matter how
you define [a mycorrhiza], what matters is how it functions
at cellular, whole plant and ecosystem levels”, ...*

*"É sempre melhor ser otimista do que ser pessimista. Até que tudo dê errado, o otimista sofreu menos"
Armando Nogueira*

Doce ou etílico, o mel da cana brota sem abelhas (autor desconhecido)

*“A literatura e a arte de modo geral é uma forma precária,
mas ainda assim poderosa de afirmar a imortalidade”
(Ariano Suassuna)*

A ciência se imortaliza através de obras literárias, é a arte do saber, e a biologia a arte da vida!

AGRADECIMENTOS

Desde o início dessa jornada, que vem dos tempos remotos do início do século XXI, quando ainda não se tinham recursos, sempre foi possível contar com o auxílio e colaboração de outros grupos de pesquisa, o que foi singular e gratificante no desenvolvimento desse projeto imortalizado nessa Tese. Não apenas pelo apoio estrutural dos respectivos laboratórios, mas principalmente por estarem abertos e suscetíveis aos nossos “apelos” científicos favorecendo ao aprendizado. Portanto gostaríamos de agradecer a:

Prof. Dr. Antonio Figueira – pela orientação e apoio incondicional em momento algum desacreditando da capacidade, sempre com curtas e oportunas palavras. A todos os membros da equipe do Lab. De Melhoramento de Plantas pelo profissionalismo e convívio familiar.

Prof^ª. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli pela orientação, apoio e palavras sábias nos momentos difíceis, a todos os profissionais e amigos do CENA-USP.

Dr. Eugênio Ulian pelo apoio e disposição em todos os momentos, que na época representante do Centro de Tencnologias Canavieiras – contrubuido gentilmente com fornecimento do material vegetal.

Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Olivera pelo apoio, amizade e disponibilidade da excelente estrutura do Laboratório de Plantas cultivadas Sob Estresse.

Prof. Dr. Cassio Abreu H. Junior – que sempre deu suporte e estrutura para a análise de nutrientes no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA-USP.

Dr. Alexandre Sebbenn pela orientação nas análises de estatística e amizade.

Prof. Dr. Márcio Lambais Rodrigues e equipe dos Laboratório de Microbiologia Molecular e Microbiologia do Solo da Esalq-USP – pela disponibilidade dos inóculos de *Glumos clarum* e estrutura da casa de vegetação. Agradecer em especial aos técnicos

Denise de L. C. Mescolotti e , Luis Fernando Baldesin e aos hoje doutores Daniele Takahashi e Simão Lindoso de Souza.

Agradeço a todos Amigos/irmãos/colegas integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LAMP-CENA-USP). Aos funcionários Wlamir Godoy, Raquel Orsi e Luís Eduardo Fonseca, pela orientação, amizade e auxílio nas várias fases deste trabalho. Aos Professores das disciplinas cursadas e à Seção de Pós-graduação do CENA-USP. Agradeço aos colegas da Pós-graduação e da Associação dos Pós-graduandos do CENA-USP, pelo convívio e aprendizado mútuo.

Ao Prof. Dr. Marcos Buckerigde, do Instituto de Botânica da USP, pela disponibilização da infra-estrutura Laboratorial, em especial a doutoranda Andréa Brandão pela sua dedicação, profissionalismo e amizade contribuindo de forma singular na fase final deste trabalho. À Fabiana Cannavan e à Profa. Dra. Siu Mui Tsai, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi, do Laboratório de Genoma Funcional e Bioinformática do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, UNICAMP, pela oportunidade de parceria junto ao Doutor Rodrigo Drummond, grande personalidade.

Aos amigos do LAMP-CENA-USP, Henrique e Joni (gringos), Mariana, Tercílio, Deborah, Luís César (Cézinha), Gildemberg (Jupará), Lorena, Janaína, Kido, Jeanne, Renato, Nebó, Lígia, Silvio, Felipe, João Bortoleto, Jurema, Aline, Daniela, Arthur, Rodrigo, Paulo Albuquerque, Silvana, Rodrigo Latado, Ariane, Ângela, Danielle Scotton pelo convívio diário em equipe, pelo auxílio em várias situações, sugestões, críticas e opiniões em prol do desenvolvimento deste trabalho. Ao amigo Vagner Benedito, pela experiência partilhada na pesquisa com sugestões sempre interessantes. Aos meus irmãos Matheus e Thiago Benatti e família.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de Doutorado.

RESUMO

ALMEIDA, R. S. Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) durante a simbiose com micorrizas arbusculares. 2007. 187 F. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

As plantas apresentam diversas adaptações fisiológicas à baixa disponibilidade de fósforo (Pi) do solo. Este trabalho discute os custos fisiológicos e energéticos associados com essas estratégias, focado nas respostas da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à disponibilidade de Pi durante a simbiose com micorrizas arbusculares (*Glomus clarum*). Esses custos são importantes componentes para a adaptação a solos com baixo Pi, afetando a aquisição e conteúdo de fósforo; o crescimento e concentração de açúcares em tecidos vegetais. Plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos com ou sem micorrizas (*Glomus clarum*), e sob a disponibilidade de baixo (20 mg kg⁻¹) ou alto (202 mg kg⁻¹) fósforo. Raízes e parte-aérea foram coletadas para as análises após 14, 30, 44 e 58 dias pós-inoculação (dpi) com *Glomus clarum*. A condição de BP causou a deficiência de Pi nas plantas, micorrízicas ou não. As plantas sob AP continham um teor foliar de Pi adequado, e partir dos 44 dpi acumularam pelo menos 6 vezes mais Pi parte-aérea, do que as cultivadas sob BP, efeito mais evidente nas micorrízicas. A eficiência de absorção, indicada pelo acúmulo de Pi na parte-aérea a uma dada biomassa da raiz, foi igual para todos os tratamentos, sugerindo que as eficiências radicular e micorrízica da absorção de Pi foram similares, independentemente das doses de Pi. A disponibilidade de fósforo não afetou a biomassa total das plantas, sendo as cultivadas sob BP mais eficientes na utilização deste nutriente. Por outro lado, as plantas micorrízicas suplementadas com BP apresentaram maior crescimento da raiz e redução na parte-aérea, resultando no aumento da proporção raiz:parte-aérea. Aos 58 dpi, a glicose, frutose e sacarose presente nas folhas de plantas micorrízicas foi 3,8, 2,3 e 2,4 vezes respectivamente mais concentrada do que nas não micorrízicas. Esses resultados sugerem que, nestas condições experimentais, o estabelecimento da simbiose não foi uma associação mutualística típica, afetando o perfil de crescimento e a alometria da cana cultivada com BP. As concentrações de fotoassimilados na folhas de planta micorrízicas indicam que houve aumentos nas taxas fotossintéticas, mas isso não resultou no maior crescimento do macrosimbionte. A tecnologia de

amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-PCR) se tornou uma opção para a validação funcional de genes, com alta sensibilidade, acurada quantificação e eficácia. A quantificação relativa da expressão gênica é conseqüentemente fácil e determina a expressão de um gene em relação a outro expresso e relativamente constante. Neste trabalho foi analisada a variabilidade de expressão dos genes de cana-de-açúcar codificando a actina (*Actina*), gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*), tubulina (*Tubulina*), e ubiquitinas (*UbiQ1* e *UbiQ2*) em diversos tecidos, e comparou-se a variabilidade obtida utilizando os programas Genorm e NormFinder. Em seguida, foram realizadas análises de expressão gênica utilizando o programa REST para a validação estatística da expressão de genes de cana-de-açúcar. O gene *UbiQ1* foi mais estável nos tecidos ou órgãos testados: meristema, inflorescência, folha, colmo e raízes tratadas com alto e baixo fósforo. Tendo o gene *UbiQ1* como referência, a expressão relativa dos genes transportadores de fosfato de alta afinidade de cana-de-açúcar *PT7* e *PT8* foi avaliada em amostras de raiz fertilizadas com alto ou baixo Pi, inoculadas ou não com fungo micorrízico e coletadas aos 58 dpi. Esses dois genes pertencem à família Pht1 de transportadores de fosfato e são similares aos ortólogos de arroz *ORYsa;tPht1;7* e *ORYsa;Pht1;8*. Sob a deficiência de Pi, o transportador de fosfato *PT7* foi induzido em raízes não colonizadas; já nas micorrízicas foi pouco expresso, sendo que altas taxas de colonização radicular suprimiram a expressão do *PT7*. O gene *PT8* pouco variou sua expressão, sendo sutilmente mais expresso em plantas micorrízicas do que nas não micorrízicas sob o suprimento de BP. Estes resultados indicam que o *PT7* é induzido em raízes sob estresse por fósforo e provavelmente associado à absorção radicular de Pi. Enquanto o gene *PT8* possui uma modulação pouco variável provavelmente envolvido na manutenção do fluxo ou homeostase de Pi, possivelmente associado com a absorção radicular e micorrízica de fosfato. O *PT7* e o *PT8* foram expressos em tratamentos de médio/longo prazo, apresentando expressão ou indução em resposta a privação por Pi, o que é consistente com a função proposta de aquisição e mobilização de Pi para esta família de transportadores. A cana-de-açúcar micorrízica mostrou alta plasticidade de resposta ao BP..

Palavras-chave: micorrizas arbusculares, fósforo, expressão gênica, RT-qPCR, sacarose.

ABSTRACT

Almeida, R. S. Sugarcane (*Saccharum* Spp.) physiological profile and phosphate transporters expression during an arbuscular mycorrhizal symbiosis . 2007. 187 P. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Plants display a wide array of physiological adaptations to low soil phosphorus (Pi) availability. This work discussed physiological and energetic costs associated with these strategies, focusing on sugarcane responses to Pi availability during the development of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis. Such costs are important components of adaptation to low phosphorus soils affecting phosphorus acquisition and level, growth and soluble sugars concentration in plant tissues. Sugarcane plants were grown in pots, with or without AM (*Glomus clarum*), and with low (20 mg kg⁻¹) or high (200 mg kg⁻¹) phosphorus supply. Roots and shoots were harvested for analysis after 14, 30, 44 and 58 days post-inoculation (dpi) with the fungus *Glomus clarum*. The low Pi supply caused Pi deficiency in mycorrhizal or non-mycorrhizal plants. The efficiency of Pi absorption, indicated by shoot Pi accumulation in correlation to root biomass, suggested that root and mycorrhizal Pi absorption were similar, regardless of the Pi doses. Phosphorus availability did not affect the whole-plant biomass, and plants under low Pi supply, used more efficiently this nutrient. On the other hand, mycorrhizal plants supplemented with low Pi presented the highest root growth and shoot reduction, resulting in high root:shoot ratio. At 58 dpi, glucose, fructose and sucrose concentrations in leaves of mycorrhizal plants were 3.8, 2.3 and 2.4-fold higher respectively, than in non-mycorrhizal plants. These results suggested that, under these experimental conditions, mycorrhizal symbiosis establishment was not a typical mutualistic association affecting sugarcane growth profile and allometry, when cultivated under low Pi. The photosynthate levels of leaves from mycorrhizal plants indicated an increase in photosynthetic rate but without resulting in higher macrobiont growth. The quantitative amplification of reversed transcripts (RT-PCR) technology has become a method of choice for functional gene validation, with sensitivity, accurate quantification and high-throughput. The relative quantification is easier determined by relative expression in comparison to a constitutively expressed reference gene. Here, the expression variability of a sugarcane actin gene (*Actin*) *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), *tubulin* (*Tubulina*), and ubiquitins (*UbiQ1* and *UbiQ2*) from various tissues

were analysed and compared based on the ranking list from the Genorm and NormFinder softwares. Expression analysis based on the REST software gave the proper statistic validation. *UbiQ1* was the most stable gene among the candidate gen-references along the various tissues or organs tested: meristem, inflorescence, leaf, stem and roots treated with high and low phosphorus. Considering *UbiQ1* as the reference gene, the relative expression of the sugarcane high-affinity phosphate transporters genes *PT7* and *PT8* were assessed from roots fertilized with low Pi or high Pi , inoculated or not with the mycorrhizal fungus, harvest 58 dpi. Both genes belong to the Pht1 Pi transporter and share similarity with the rice orthologs *ORYsat;Pht1;7* and *ORYsat;Pht1;8*. Under Pi deficiency, the phosphate transporter *PT7* was induced in non-colonized roots, but less expressed in mycorrhizedl ones, with high root colonization rate suppressing *PT7* expression. *PT8* showed low variability in expression, slightly more expressed in mycorrhized plants than in non-mycorrhized plants under low Pi supply. These results indicated that *PT7* was induced in Pi stressed roots, and possibly associated with the root Pi uptake, while *PT8* had limited modulation in expression and probably involved on Pi fluxes or homeostasis, likely associated with both root and mycorrhizal phosphate uptake pathways. *PT7* and *PT8* were induced during medium/long-term treatments, showing induction or constant expression in both acquisition and mobilization of Pi in response to Pi deprivation, which is consistent with the proposed role of this transporter family. Mycorrhizedl sugarcane showed a highly plastic response to low Pi.

KEYWORDS: ARBUSCULAR MYCORRHIZAL, PHOSPHORUS, GENE EXPRESSION, RT-QPCR, SUCROSE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FMA	Fungo micorrízico arbuscular
MA	Micorriza arbuscular
AP	Alto fósforo, dose maior utilizada nos experimentos (200 mg kg ⁻¹)
BP	Baixo fósforo, dose menor (20 mg kg ⁻¹)
Gc	Plantas inoculadas ou micorrízicas com fungo <i>Glomus clarum</i>
ni	Plantas não inoculadas, sem micorrizas
dpi	Dias pós-inoculação com esporos e hifas do fungo micorrízico arbuscular
MS	Massa seca
R	Raiz
PA	Parte aérea
R:PA	Razão, proporção entre raiz e parte aérea
TCA	Taxa de crescimento absoluto (g dia ⁻¹)
TCR	Taxa de crescimento relativo (g g ⁻¹ dia ⁻¹)
TCI	Taxa de colonização intra-radicular (%)
Pi	Fósforo inorgânico, ortofosfato na forma de ânion
SUCEST	Projeto do transcriptoma de cana-de-açúcar (ESTs) da FAPESP
SAGE	Análise serial da expressão gênica
C ₄	tipo fotossintético com fixação de CO ₂ inicial em ácido orgânico com 4 C
EST	Etiqueta de sequência expressa
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar ao mRNA
PCR	reação em cadeia da polimerase
AFLP	polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
poli-T	Polímero de nucleotídeos de base timina
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real
<i>cluster</i>	agrupamento de ESTs alinhados
TAIL-PCR	PCR termicamente assimétrica
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
ATP	adenosina trifosfato
RPA	Ensaio de proteção contra ribonuclease
<i>Northern Blot</i>	Técnica de hibridização para detecção de genes transcritos

SYBR GREEN	Molécula capaz de ligar-se a ácidos nucleicos e produzir fluorescência
BLAST	Ferramenta de bioinformática para busca de seqüências similares de NA
TC	Seqüência de gene potencial obtida pelo agrupamento similares
UTR	Região não traduzida de um gene
Ct	Ciclo limite de detecção de fluorescência em PCR em Tempo Real
ORF	“Quadro aberto de leitura”, seqüência está contida a região transcrita de um gene

LISTA DE SÍMBOLOS

pb	pares de bases
°C	graus Celsius
U	unidade de enzima (Weiss)
min	Minuto
ng	Nanograma
μL	Microlitro
H	Hora
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	O Fósforo	21
2.2	Absorção e utilização do fósforo	22
2.3	Efeitos da deficiência de fósforo nas plantas	24
2.3.1	Regulação do metabolismo	25
2.3.2	Indução de fosfatases ácidas	28
2.3.3	Reciclagem do P: ativação de rotas alternativas	28
2.3.4	Exsudatos radiculares	29
2.3.5	Alteração no desenvolvimento e função radicular	29
2.3.6	Modificações na proporção raiz parte aérea	30
2.3.7	Modulação da expressão de transportadores de fosfato	30
2.4	Fungos micorrízicos arbusculares	32
2.5	Uso sustentável do fósforo	35
3	PERFIL FISIOLÓGICO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB EFEITO DO FÓSFORO DURANTE A SIMBIOSE COM MICORRIZAS ARBUSCULARES	37
	RESUMO	38
	ABSTRACT.....	39
3.1	INTRODUÇÃO	40
3.2	REVISÃO DE LITERATURA	42
3.2.1	Fatores que afetam as micorrizas arbusculares	44
3.2.1.1	Efeitos do fósforo	44
3.2.1.2	Efeitos de outros nutrientes	46
3.2.1.3	Efeito do pH	47
3.2.2	Efeitos no crescimento da planta hospedeira	47
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.3.1	Material vegetal e condução do experimento	49
3.3.2	Coleta e processamento de amostras	51
3.3.3	Taxa de colonização de raízes	51
3.3.4	Determinação do teor de nutrientes	51
3.3.5	Taxa de crescimento absoluta	52
3.3.6	Taxa de crescimento relativo	52
3.3.7	Razão de eficiência radicular	52
3.3.8	Índice de utilização de P	52
3.3.9	Proporção entre raiz e parte-aérea	52
3.3.10	Determinação da concentração de açúcares solúveis	53
3.3.11	Análise estatística	54
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

3.4.1	Avaliação do estado nutricional das plantas	56
3.4.2	Colonização das raízes	62
3.4.2.1	Micorrizas arbusculares.....	62
3.4.2.2	Presença do fungo quitridiomíceto	66
3.4.3	Absorção e uso do Fósforo	66
3.4.3.1	Concentração de P.....	66
3.4.3.2	Conteúdo de P	70
3.4.4	Acúmulo de biomassa das Plantas	72
3.4.5	Taxa de crescimento relativo	79
3.4.6	Eficiência de absorção e utilização de fósforo	80
3.4.7	Efeito da simbiose na proporção raiz parte aérea	85
3.4.8	Partição de carbono	87
3.5	CONCLUSÕES	94
4.	ESTUDO DE GENES DE REFERÊNCIA E VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE FOSFATO EM RAÍZES MICORRÍZICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR	95
	RESUMO	96
	ABSTRACT	98
4.1	INTRODUÇÃO	100
4.2	REVISÃO DE LITERATURA	103
4.2.1	PCR na era genômica: em tempo real.....	103
4.2.2	Químicas populares: SYBR® Green, TaqMan® e Molecular Beacons.....	104
4.2.3	Estratégias para quantificação de expressão	106
4.2.4	qPCR: virtudes e imperfeições.....	107
4.2.4.1	Cuidados para normalização.....	108
a.	Amostragem.....	108
b.	Quantificação do RNA	109
c.	Pureza da amostra	109
d.	Normalização contra o RNA Total	110
e.	Normalização contra o DNA genômico	110
f.	Genes de referência	111
g.	Moléculas artificiais	113
4.2.5	Fungos Micorrízicos Arbusculares.....	115
4.2.6	Transportadores de fósforo (PT)	116
4.2.7	Validação de expressão em cana-de-açúcar via qPCR	122
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	124
4.3.1	Teste de genes de referência	124
4.3.1.1	Material vegetal	124
4.3.1.2	Purificação de RNA e síntese de cDNA.....	124

4.3.1.3	Desenho de iniciadores.....	125
4.3.1.4	PCR em Tempo Real	126
4.3.1.5	Delineamento experimental e estabilidade de expressão gênica	126
4.3.2	Expressão gênica durante simbiose micorrízica entre o fungo <i>Glomus clarum</i> e cana-de-açúcar.....	128
4.3.2.1	Extração de RNA	128
4.3.2.2	Síntese da primeira fita de cDNA	128
4.3.2.3	Amplificação do DNA e cDNA pela reação em cadeia da polimerase	129
4.3.2.4	Análises de expressão via qPCR	129
4.3.3	<i>Southern</i> não radioativo	130
4.3.3.1	Purificação de fragmentos	130
4.3.3.2	Marcação de sonda	130
4.3.3.3	Hibridização e detecção de sinal	131
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	132
4.4.1	Seleção de genes.....	132
4.4.2	Normalização da expressão gênica em qPCR	138
4.4.3	<i>NormFinder</i> x <i>GeNorm</i> : resultado	139
4.4.4	Validação do melhor candidato par todos os tecidos	142
4.4.5	Normalizador gene-múltiplo: um é bom, dois pode ser.....	145
4.4.6	Variabilidade de expressão gênica	147
4.4.7	Simulação do uso de HKG como normalizadores	148
4.4.8	Consistência das análises de variabilidade na seleção de genes de referência ...	152
4.4.9	Validação da expressão gênica em cada tecido	153
4.4.10	Estudo de transportadores de fosfato de cana-de-açúcar	157
5.	CONCLUSÕES	172
6.	REFERÊNCIAS	173

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um elemento essencial à vida, entretanto a exploração dessa fonte mineral não renovável nas atuais proporções não é sustentável. No último século, as reservas minerais de fósforo vêm sendo intensamente exploradas e consumidas pelas atividades humanas. A utilização de fertilizantes é responsável por 80 % desse dispêndio ^[1]. Nas terras cultiváveis, a indisponibilidade do P restringe em 30 a 40 % a produtividade ^[2, 3], assim os fertilizantes fosfatados são largamente aplicados na agricultura para garantir a disponibilidade de P e a produtividade. Diante da corrente taxa de consumo de P, alguns autores estimaram que dentro dos próximos cem anos as reservas de rochas de fosfato no mundo estarão esgotadas ^[4,5]. O amplo uso do fósforo está relacionado em parte com a contaminação da água, elevando a concentração do mesmo e causando a eutroficação de ambientes aquáticos. O manejo do fósforo, especialmente na agricultura sustentável, deve considerar esse nutriente como fonte mineral escassa e agente potencial da eutroficação^[1]. Nesse sentido, o uso eficiente do fósforo na agropecuária é tático para se atingir o manejo global sustentável.

A introdução da cultura da cana-de-açúcar e a sua história agro-econômica confundem-se com a fundação do Brasil. Nesta nação tropical, esta atividade agrícola tornou-se num agronegócio capaz de gerar, em termos de produto final, mais de 10 bilhões de dólares ano⁻¹, com 1 milhão de empregos diretos. A cana brasileira possui o menor custo de produção do mundo e seqüestro de 20 % das emissões de carbono que o setor de combustíveis fósseis emite no país^[6].

A cadeia produtiva canavieira contribuiu para a agroindústria do estado de São Paulo com 370 mil equivalentes homem ano⁻¹, o que representou 46 % do total empregado na agropecuária paulista, segundo a Organização dos Plantadores de Cana-de-açúcar do Estado de São Paulo ^[7]. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo que o estado de São Paulo foi responsável por aproximadamente 60% da produção nacional e 69 % da

produção da região Centro-Sul no país, na safra 2006/07. A área da cultura agrícola aumentou 6%, passando de 5,84 milhões de hectares no ciclo 2005/06 para 6,19 milhões ha^{-1} em 2006/07 ^[8].

Dado a importância mencionada do setor sucroalcooleiro na economia nacional e a demanda global para os próximos anos, em álcool principalmente, novos investimentos e pesquisas são necessários para atender os desafios que o setor enfrentará para continuar crescendo às taxas atuais, mantendo a sua liderança mundial. Nesse contexto, o emprego da biotecnologia no melhoramento genético é de grande valia para acelerar a obtenção de variedades mais produtivas ou eficientes, visando reduzir a aplicação de insumos e, por conseguinte diminuir os custos e efeitos indesejáveis ao ambiente.

Na questão do fósforo como recurso natural e do seu emprego na cultura canavieira, o estudo de micorrizas pode fornecer subsídios para desenvolvimento de biotecnologias a fim de incrementar a produção de uma maneira mais limpa, através da redução das adubações fosfatadas, do manejo e conservação do solo, possibilitando os benefícios ambientais e econômicos desejados.

A análise do crescimento e, conseqüentemente, da produtividade (biomassa, frutos, grãos), é uma abordagem funcional para o estudo do desenvolvimento ^[9] que pode ser empregado para esclarecer as respostas das plantas ao estresse. A determinação de mudanças moleculares, alterações no crescimento, alometria, estado nutricional, metabolismo e suas implicações contribuem para o melhor entendimento da produtividade de uma cultura ^[10,11], integradas a condições de estresse induzido ou sob interação com microrganismos, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), podem resultar em contribuições para o desenvolvimento sustentável. Não foram realizados estudos prévios em cana-de-açúcar durante a simbiose com micorrizas arbusculares (MA) descrevendo a cinética do crescimento, estado nutricional e correlações fisiológicas e moleculares com o teor de açúcares solúveis e a expressão de transportadores de fosfato. O objetivo deste trabalho foi descrever a alteração do estado nutricional por fósforo em cana-de-açúcar associada à

efetividade simbiótica de micorrizas e suas relações com o crescimento e a modulação de dois genes de transportadores de fosfato desta versátil gramínea C_4 , fonte global de sacarose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Fósforo

O fósforo é o componente central dos principais processos metabólicos, incluindo a fotossíntese e a respiração, portanto é um dos nutrientes essenciais requeridos para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Esse elemento possui distintas funções atuando em diversos processos biológicos: produção de energia, glicólise, síntese de ácidos nucleicos, síntese e estabilidade de membrana, inativação/ativação de enzimas, reações de redox, sinalização, metabolismo de carboidratos e fixação de N ^[12]. No metabolismo celular, existem vários compostos intermediários que se apresentam como ésteres de fosfato, enquanto outros metabólitos intermediários possuem ligações fosfo-anídricas funcionais, como ATP e pirofosfato (PPi), que transferem energia de processos energéticos como a fotofosforilação, fosforilação oxidativa, fosforilação de substratos, para processos dependentes de energia, como a biossíntese de compostos, bombeamento de íons e trabalho mecânico. Em certas vias e processos metabólicos, como a desfosforilação enzimática de ligações éster ativada por Pi, a atividade da amido-fosforilase, podem ser substituídas via hidrólise de H₂O, como uma etapa intermediária na conservação de energia. A vital função do Pi na fotofosforilação e translocação de triose fosfato entre plastídios e citosol atesta a central importância do Pi na fotossíntese ^[13,14]. Em virtude da sua essencialidade, a deficiência de fósforo afeta o crescimento, desenvolvimento vegetal, conseqüentemente a produtividade agrícola.

Na natureza o fósforo apresenta baixa mobilidade no solo, sendo um dos nutrientes que mais limita o crescimento e desenvolvimento das plantas ^[15], principalmente em regiões tropicais e semi-áridas ^[16]. O fósforo ocorre no solo principalmente na forma de ortofosfato, cuja concentração total é taxada, por alguns autores, na faixa de 500 a 800 mg kg⁻¹ de solo

seco^[17] ou ainda entre 100 a 2000 mg kg⁻¹ ^[18]. Embora a quantidade total no solo seja relativamente abundante, boa parte do P encontra-se indisponível para absorção. Menos de 0,1 % desse total encontra-se na solução do solo. Essa variação está associada ao material de origem, grau de intemperismo, teor de matéria orgânica e da reação do solo ^[19].

A disponibilidade de P é controlada pela força iônica, pH baixo, concentração de P e metais (Fe, Al e Ca), e ânions competitivos e/ou ácidos orgânicos ^[20]. Além destes fatores, as reações que controlam as quantidades de P_i na solução do solo incluem a dissolução/precipitação de minerais carreadores de P, adsorção/desadsorção do fosfato das superfícies do solo e a hidrólise da matéria orgânica ^[16, 20].

2.2 Absorção e utilização do fósforo

O fósforo é absorvido na forma aniônica oxidada de ortofosfato, H₂PO₄⁻ e HPO₄⁻² (P_i), presente na solução do solo em baixas concentrações que variam entre 0,1 e 10 µM ^[20]. Em média, a concentração do fosfato inorgânico (P_i) na solução do solo é de 1 µM, enquanto na planta pode exceder em duas mil vezes ^[21, 22]. No solo, o P encontra-se em quantidades da ordem de 500 a 2000 ppm ^[23]. Metade deste pode ser de origem orgânica, o qual precisa ser mineralizada antes de poder ser absorvido pelas plantas ^[23]. O pH favorável à absorção de P_i encontra-se na faixa de 4,5–5,0 onde as plantas obtêm preferencialmente o ânion monovalente H₂PO₄⁻ em relação ao HPO₄⁻² ^[12]. Em virtude de sua capacidade reativa com os componentes do solo, o transporte de P para as plantas ocorre via difusão e não via fluxo de massa ^[23]. Na superfície radicular o P_i é facilmente adquirido formando uma zona de depressão de P_i de 0,2 a 1,0 mm em torno da raiz ^[24].

Estudos da cinética de absorção de P_i utilizando inibidores, demonstraram que o transporte ativo de P_i é necessário para que as plantas superarem a diferença de concentração entre a solução do solo (µM) e o simplasto (mM), assim como o potencial negativo de membrana ^[12]. A redução drástica no acúmulo de P_i em tecidos tratados com inibidores para transportá-lo, ratifica o requerimento de energia para manter a absorção ^[12, 21]. Associado ao

transporte do íon ortofosfato, observou-se a acidificação do citoplasma quando da adição de P_i a células vegetais sob deficiência de P. Este fato sugere que H^+ é o produto co-transportado durante a absorção de fosfato na maioria das plantas [22].

As diversas espécies de plantas apresentam capacidades de absorção de nutrientes variáveis. Em relação apenas à eficiência de absorção, esta pode ser definida pela absorção total do nutriente na planta (g ou mg planta⁻¹), influxo ou taxa de absorção específica ($mol\ cm^{-1}\ s^{-1}$ ou $mol\ g^{-1}\ s^{-1}$) [25]. Entre gramíneas e leguminosas, as primeiras são mais agressivas no crescimento sob limitações por fósforo, embora as leguminosas apresentem maior influxo de P_i , conciliado com um crescimento radicular mais lento. Enfim, a eficiência de absorção está relacionada com a maior produção de área radicular em função das limitações da difusão de P no solo, do que a velocidade de absorção em si [26]. As limitações nutricionais, principalmente por N e P, acarretam restrições ao crescimento vegetal aumentando ainda mais o consumo de carboidratos pelas raízes, reduzindo o crescimento da parte aérea e alterando a proporção raiz:parte-aérea [26]. As espécies com alta eficiência de absorção de P_i apresentam elevado influxo ou elevada proporção raiz:parte-aérea, enquanto espécies com baixa eficiência apresentam baixo influxo e baixa razão raiz:parte-aérea [27]. Algumas medidas fisiológicas são comumente utilizadas para avaliar a eficiência de absorção de P para espécies de plantas e cultivares dentre espécie: conteúdo de P acumulado por planta (mg planta⁻¹) que permite uma comparação preliminar entre genótipos; razão da eficiência radicular (RER) definida como a quantidade de P absorvida pela planta por unidade de peso da raiz ($mg\ g_R^{-1}$), traduzindo a habilidade da planta em obter o P do solo, parâmetro pouco relatado em trabalhos [28]. A taxa de acúmulo absoluta (TAA) ou taxa de crescimento absoluto (TCA), que relaciona a velocidade do acúmulo por unidade de tempo ($mg\ P\ dia^{-1}$); atividade específica de ³²P e outros [26, 29].

A eficiência de utilização de um nutriente pode ser definida pela quantidade de biomassa total por unidade do nutriente absorvido ($g_{MST}\ mg^{-1}\ P$) ou por nutriente aplicado no solo [25,30]. Essa razão tem sido descrita como **"coeficiente de utilização"**, **"quociente de**

utilização” ou **“razão de eficiência”**. A relação entre a quantidade total de P absorvida, seu efeito tanto no metabolismo quanto no acúmulo de biomassa determinará a eficiência com que esse nutriente está sendo utilizado. Ao se estudar o coeficiente de utilização do P em função de sua disponibilidade, esse coeficiente produz uma relação inversa entre o valor do coeficiente e a dose de fósforo ^[31]. Isto indica que, para a mesma biomassa acumulada, as plantas submetidas a menor dose de P_i são mais eficientes. Entretanto, a severa limitação por P_i causa a deficiência do nutriente que, por sua vez, restringe o crescimento. Assim o coeficiente de eficiência de uso do P poderá ser aparentemente alto pelo efeito de diluição do P no limitado crescimento. Um valor baixo do coeficiente pode ser obtido sob efeito de alta dose de P_i quando a absorção é contínua, devido ao acúmulo de reservas no vacúolo, sem que haja um incremento proporcional na biomassa. Ao se avaliar a eficiência de utilização a concentração total do nutriente deve ser considerada, a qual deve estar acima de um nível crítico para ótima atuação no metabolismo, resultando no pleno desenvolvimento e máximo crescimento ^[31]. Portanto, é interessante expressar a eficiência de utilização de P com base na concentração foliar do nutriente, levando em conta que as folhas são os órgãos fonte de fotoassimilados destinados ao crescimento. Após a absorção de fósforo pelas raízes, a expressão de eficiência de utilização do fósforo poderá contribuir para avaliar diferenças observadas no crescimento vegetal sob efeito de doses de P_i . Entretanto, os resultados disponíveis na literatura não possibilitam definir qual componente fisiológico é mais importante para crescimento vegetal sob fonte limitante de P_i , a **“eficiência de absorção”** ou a **“eficiência de utilização”** ^[26].

2.3 Efeitos da deficiência de fósforo nas plantas

As plantas possuem uma variada gama de adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, em resposta à deficiência de fósforo ^[12]. Para demonstrar a significância dessas modificações, os efeitos do estresse por fósforo no metabolismo devem ser considerados e demonstrados. O P_i é importante modulador da expressão gênica em plantas e, sendo assim o

status nutricional de Pi possui uma influência central nos níveis de expressão de vários transportadores de membrana e enzimas ^[33]. Possivelmente, a principal função do fósforo nas plantas, sob a deficiência de Pi, é monitorar bioquímica e ou metabolicamente as respostas, exercendo um papel central no controle fino e acurado das enzimas pré-existentes ^[12, 33]. Um bom exemplo, é a regulação da fosfatase ácida (Apase) durante o estresse por Pi, envolvendo tanto a síntese *de novo* de fosfatases ácidas adicionais, quanto a ativação de Apases pré-existentes que são potentemente inibidas por Pi ^[33]. O envolvimento do Pi como substrato ou produto de reações enzimáticas é amplamente difundido dentre as vias do anabolismo e catabolismo celular de plantas. Contudo, o Pi também é um potente ativador ou inibidor alostérico de enzimas regulatórias que possuem uma função essencial na restrição de taxas bioquímicas do metabolismo primário ^[34, 35]. Outro exemplo é a principal enzima regulatória da via de síntese de amido, a adenosina-5'-fosfato-glicose pirofosforilase (ADPG pirofosforilase), que possui potente inibição alostérica por Pi ^[35]. A produção de plantas transgênicas de tomateiro acumuladoras de amido, pela expressão da enzima ADPG pirofosforilase de bactéria, insensível ao Pi, demonstrou que o caráter alostérico da regulação dessa enzima de plastídios é a principal regulação fisiológica que coordena a biossíntese de amido. Presume-se então, que o acúmulo de amido em células de plantas sob deficiência de fósforo tem como o mecanismo regulatório principal a libertação da ADPG pirofosforilase da inibição por Pi ^[39]. É evidente que o profundo conhecimento das respostas metabólicas à deficiência por fósforo necessita não somente da caracterização de como o Pi é indutor da expressão gênica, mas também da compreensão de como alterações fisiológicas relevantes do fósforo intracelular regulam a expressão gênica de enzimas pré-existentes ^[32].

2.3.1 Regulação do metabolismo

O equilíbrio harmonioso das concentrações de Pi na matriz citoplasmática é importante para a regulação de reações enzimáticas. Esta homeostase resulta do re-arranjo das reservas (*pools*) de fósforo intracelulares de Pi e das trocas através de compartimentos

e do equilíbrio com o meio externo. Essas reservas na planta são classificadas de várias formas: (i) de acordo com sua localização em compartimentos físicos ou organelas (citoplasma, apoplasto, vacúolo, núcleo), (ii) pela forma química de fósforo tais como ortofosfato ou fósforo inorgânico (Pi), ésteres de P, fosfolipídios e ácidos nucleicos; (iii) de acordo com sua função fisiológica nas formas de reserva e cíclica. A mais rápida e comum manifestação da privação de fósforo é o decréscimo na concentração intracelular de Pi [37]. Em 1963, estudos feitos com radioisótopos demonstraram a primeira evidência da função do vacúolo e do citoplasma como compartimentos de Pi distintos em células das plantas [21]. Subseqüentemente, estudos in vivo de ressonância magnética nuclear com ^{31}P [22, 38], confirmaram que as células vegetais das plantas distribuem seletivamente o Pi entre o citoplasma e o vacúolo. O vacúolo contém cerca de 85 a 95 % do total do fósforo celular em plantas saudáveis [37]. Esse Pi vacuolar não é metabólico e atua como tamponante para flutuações do Pi citoplasmático devido a alterações transientes do ambiente. Durante as limitações de fósforo, o Pi vacuolar é liberado para o citosol de forma controlada de modo correlacionado com o estresse por Pi [32]. A manutenção seletiva do fósforo citoplasmático preserva, relativamente constantes as concentrações de Pi, nos compartimentos metabolicamente ativos durante flutuações momentâneas da disponibilidade de Pi [40]. Assim a célula garante as condições mínimas favoráveis ao metabolismo, evitando perturbações transientes devido às flutuações de fósforo no ambiente e a indução desnecessária e energeticamente dispendiosa da indução de respostas adaptativas ao estresse por fósforo [32].

A regulação do efluxo de Pi através do tonoplasto, como parte dos mecanismos de manutenção da homeostase citoplasmática de Pi, não é compreendida completamente. Entretanto, vários estudos indicam que a permeabilidade do tonoplasto é baixa, porém cresce significativamente quando da deficiência de Pi [22, 38, 39, 40]. Somente quando as reservas do vacúolo estão completamente esgotadas, desprovidas de Pi, é que começam a declinar as concentrações do citoplasma [38, 41, 42, 43], concomitantemente com vários

mecanismos de recuperação e mobilização de P_i diante da deficiência de fósforo. Estimativas da concentração ótima de P_i , em células de plantas saudáveis variam entre 5 a 17 mM [40, 41, 43]. Em plantas de soja deficientes por P, a concentração citoplasmática de P_i variou entre 0,01 e 0,23 mM, enquanto a concentração nas folhas suficiente para o bom desenvolvimento estava acima de 5 mM [42].

O fósforo é móvel na planta, podendo ser transportado tanto para a parte aérea quanto para a raiz. A maior parte do P_i absorvido pelas raízes é transportada via xilema para as partes da planta em crescimento, como folhas novas e em expansão [40, 44]. Nos estágios iniciais da deficiência de P_i , quando o crescimento ainda não foi afetado, o P_i é menos retido nas raízes, sendo maior o transporte para a parte aérea do que em plantas não deficientes [46]. Sob a deficiência de P_i em um nível mais avançado, ocorre o transporte da raiz para os tecidos jovens e a re-alocação de P_i das folhas velhas para as novas e regiões de crescimento [22,38]. Corroborando com essa afirmação, plântulas de *Brassica nigra* retardaram cerca de 10 dias os sintomas foliares de P_i em relação às raízes [46]. A re-alocação de P_i , acredita-se, que ocorra via floema, embora pouco se saiba sobre os mecanismos de distribuição de fósforo na planta como um todo sob a deficiência de P_i [32].

As plantas desenvolveram diversas estratégias para aquisição e uso do P em ambientes de baixa fertilidade, sendo umas abalizadas na conservação do uso e outras direcionadas a eficácia de aquisição e absorção do P [47]. Processos que otimizam o uso do P envolvem redução na taxa de crescimento, incremento de massa por unidade de P absorvido, mobilização e (re-) alocação do fosfato inorgânico (P_i) interno, modificações no metabolismo de carbono ativando reações que não requerem P_i e vias alternativas da respiração [12, 22, 32, 48 49, 50]. Os processos que levam a absorção eficaz de P_i incluem: incremento na produção e secreção de fosfatases, exsudação de ácidos orgânicos, maior crescimento das raízes combinado com modificações na arquitetura radicular, expansão das superfícies de absorção pela proliferação de pêlos radiculares, e expressão de transportadores de fosfato [12,48]. Por fim, a simbiose com micorrizas, predominante entre as plantas terrestres.

Em plantas supra-supridas com 125 μM de P_i , as concentrações de P no xilema chegam a 7 mM enquanto em plantas deficientes o status de P é em torno de 1 mM ^[40]. O transporte de fósforo ocorre via xilema das raízes para parte aérea. A re-alocação via floema, da parte aérea para regiões de crescimento, tanto na parte aérea quanto na raiz, é dependente do grau da deficiência de fósforo ^[22,38]. Essa mobilização de P das folhas mais velhas envolve o consumo das reservas de P_i e a quebra do P orgânico, prevalecendo o transporte de P_i no xilema e P orgânico no floema ^[22].

2.3.2 Indução de fosfatases ácidas

A indução de atividade da fosfatase ácida (APase) é um sintoma bioquímico comum em resposta ao estresse por fósforo ^[33]. Esse tipo de resposta à privação de P_i é comum entre bactérias, fungos e leveduras ^[37]. As Apases de plantas podem funcionar como um sistema intra- ou extra-celular de salvaguarda de fosfato, liberando P_i de ésteres fosfato assim como solubilizando o fósforo mineral do solo ^[33, 37]. A indução da atividade de Apases intracelulares tem sido descrita em plantas, incluindo-se, dentre outras, plântulas ou células em suspensão de *B. nigra* e *B. napus* ^[32, 46].

2.3.3 Reciclagem do P: ativação de rotas alternativas

O RNA é uma fonte importante de fósforo que pode ser explorada em função de severa deficiência de fósforo. Foi demonstrada uma forte indução de ribonucleases intra e extracelulares diante da privação por fósforo em *Arabidopsis*, fumo e células em suspensão de tomateiro ^[32]. A degradação de moléculas de mRNA disponibiliza vários componentes, incluindo o fósforo, que contribui para a sua reciclagem e sobrevivência das plantas sob deficiência de P_i . De forma análoga, a indução de vias alternativas na glicólise, tais como: fosfofrutoquinase (PFK) dependente de pirofosfato (PP_i), fosfoenolpiruvato (PEP), fosfatase e PEP carboxilase (PEPcase), assim como enzimas centrais envolvidas na biossíntese de compostos aromáticos induzidas pela deficiência de fósforo, podem facilitar a busca de P_i intracelular ^[32]. Portanto, estas constituem parte do sistema metabólico de reciclagem de

fósforo com dupla função. A ativação desse sistema metabólico possivelmente favorece a respiração, exsudação de ácidos orgânicos, ou a biossíntese de compostos aromáticos em função do estresse por fósforo ^[32], e simultaneamente libera o P_i para sua re-assimilação no metabolismo ^[32, 33, 34].

2.3.4 Exsudatos radiculares

A exsudação de compostos orgânicos da raiz pode alterar a química da rizosfera, a população de microrganismos do solo, a competição e o crescimento vegetal. Estes compostos possuem funções diversas podendo afetar processos como sinalização das interações planta-microrganismo, alelopatia e aquisição de nutrientes ^[51]. Sob influência do ambiente (estresse), os compostos exsudatos da raiz variam em quantidade e qualidade ^[51, 52]. A exsudação de ácidos orgânicos (malato e citrato) permite a quelação de Al^{3+} , Fe^{3+} e Ca^{2+} e subsequente solubilização do P_i ligado ou precipitado como mecanismo aliviador do estresse ^[21], possivelmente também tornando o P orgânico mais suscetível à hidrólise por APases ^[48].

2.3.5 Alteração no desenvolvimento e função radicular

As raízes são o ponto inicial da absorção de elementos minerais necessários ao crescimento das plantas. Assim, o crescimento e desenvolvimento da raiz apresentam a plasticidade e variabilidade em função de variantes do solo (fertilidade, umidade, concentração de oxigênio, densidade, pH e fatores bióticos) ^[53]. As plantas respondem tipicamente a deficiência de P_i alocando mais carbono na raiz, o que resulta no crescimento da raiz, formação de raízes laterais, maior capacidade de exploração da superfície do solo, aumentando o comprimento e número de pêlos radiculares ^[54, 55], aumentando a expressão de transportadores de fosfato ^[56, 57, 58], e exsudação de ácidos orgânicos e fosfatases que incrementam a disponibilidade de P_i ^[12, 60].

Cluster roots (ou *proteoid roots*) é uma estrutura radicular que compreende um agrupamento de alta densidade de raízes laterais formadas a partir do eixo principal que se encontra em espécies adaptadas a solos de baixa fertilidade, incluindo-se membros das

Betulaceae, *Casuarinaceae*, *Curcubitaceae*, *Cyperaceae*, *Eleagnaceae*, *Leguminosae*, *Moraceae*, *Myrtaceae* e *Restionaceae* [61, 62, 63]. A formação de *cluster roots* é induzida pela deficiência de P, resultando em modificações bioquímicas coordenadas no desenvolvimento da raiz [48]. O tremoço branco (*Lupinus albus* L.) é uma planta pequena que produz copiosas quantidades de ácidos orgânicos, prótons (H⁺) e fosfatases ácidas (APase) que são exsudadas e provocam modificações bioquímicas na região ocupadas por *cluster roots* durante o estresse por P [62]. Esta leguminosa tem sido um sistema modelo de elucidação e entendimento das adaptações não micorrízicas à deficiência de P [63].

2.3.6 Modificações na proporção raiz:parte aérea

Adaptações no crescimento e/ou morfologia durante o estresse por fósforo consistem na preservação do conteúdo de Pi nas folhas. O fósforo é importante na distribuição de massa seca entre raiz e parte aérea. Sob efeito do estresse por Pi, alterações alótropicas na relação raiz:parte-aérea são resultantes da redução do crescimento da parte superior da planta, incremento na absorção do fosfato e o favorecimento do crescimento das raízes [12, 22]. Em plantas de fumo sob estresse por fósforo foi observado o aumento na razão raiz:parte-aérea e a manutenção da atividade da invertase de raiz em relação à atividade nas folhas [64]. Um resultado similar foi encontrado em estudos que monitoraram a taxa fotossintética, a translocação de fotossintato marcado com ¹⁴C e a radiação específica das frações de açúcares nas raízes de plantas sob estresse ou não por Pi de feijão. A radioatividade das frações de açúcar assim como os níveis de sacarose e glicose nas raízes indicaram um intenso transporte de açúcares das folhas para as raízes das plantas sob estresse por fósforo [65].

2.3.7 Modulação da expressão de transportadores de fosfato

A plasmalema das células radiculares da epiderme e do córtex é a fronteira entre o apoplasto e o simplasto. O transporte de nutrientes através da membrana é um crítico processo seletivo e regulatório da homeostase celular de nutrientes, inclusive do fósforo.

Pesquisas de cinética demonstram que as plantas possuem os sistemas de absorção de baixa e de alta afinidade por fosfato ^[21], sendo o último ativado sob deficiência de fósforo ^[12]. O isolamento de genes de plantas que codificam transportadores de fosfato (TP), similares aos encontrado em leveduras e fungos, deu origem à família *Pht-1* de transportadores de fosfato que atuam na absorção, transporte e reciclagem de Pi na planta. A resposta desses genes é consideravelmente intensificada sob a privação por fósforo, seguida da desativação diante da disponibilidade do nutriente, assim primeiramente demonstrado para os genes *Pht-1;1* e *Pht-1;2* de *Arabidopsis* ^[67]. A dinâmica do transporte de fosfato em plantas demonstrou que status de P na planta desencadeia a regulação de expressão de membros da família *Pht-1* envolvidos na aquisição de Pi pelas raízes ^[12,67, 68]. Outras pesquisas em plantas, como tomateiro, batata, fumo, arroz, *Hordeum vulgare*, *Betula pendula*, *Medicago truncatula*, milho, vêm mostrando que transportadores de fosfato radiculares possuem respostas similares aos genes *Pht-1;1* e *Pht-1;2* de *Arabidopsis* ^[12,67, 68, 69], ou apresentam expressão constitutiva ou induzida pela deficiência de Pi, ou ainda serem induzidos sob efeito da simbiose com micorriza arbusculares ^[69, 70]. A partir do complemento funcional de mutantes de leveduras deficientes para o transporte de Pi, surgiu a oportunidade para o isolamento e caracterização de novos transportadores de fosfato (TP) de diversas plantas: *Arabidopsis thaliana* ^[56, 66, 72], *Solanum tuberosum* ^[53], *Catharanthus roseus* ^[73], *Lycopersicon esculentum* ^[58, 74], *Medicago truncatula* ^[75, 76], *Hordeum vulgare* ^[77], *Saccharum* spp. ^[78], *Oryza sativa* ^[79]. A identificação de pelo menos 16 transportadores de fosfato no genoma da *Arabidopsis* e 13 no de arroz sugerem que as plantas possuem múltiplos TP funcionais em tecidos e órgãos específicos ^[12, 54].

Alguns transportadores de fosfato processam o carregamento de Pi para o xilema ou floema, transporte para células das raízes, folhas, flores e tecidos de reserva, e o efluxo de fosfato para fora da raiz também ^[12, 67]. A sequência deduzida da proteína indica que os TP possuem uma massa de 58 kDa arranjada em 524 a 550 resíduos de aminoácidos. A utilização de anticorpo específico para o transportador *LePT1* confirmou sua ativação mediante a privação por fósforo em tomateiro, indicando que indução do mRNA do gene traduziu-se na

proteína LePT1^[80]. Portanto o número total de transportadores fosfato nas plasmalemas da raiz aumentou quando o fosfato disponível estava subótimo.

Análises via *western blot* indicam que essas proteínas transportadoras de fosfato possuem vida curta e são rapidamente recicladas^[80], concordando com uma vida média do mRNA de cerca de 2 h, sugerido por Smith et al. (1997), possibilitando a modulação rápida dos transportadores de fósforo pelo controle transcricional^[66]. A regulação do transporte de fósforo por modificações pós-traducionais, em especial via glicosilação ou fosforilação, é uma forte evidência presente nos sítios regulatórios fortemente conservados nas seqüências de aminoácidos de TP em mono e dicotiledôneas^[12, 56, 57, 67, 67, 68].

2.4 Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

A simbiose conhecida como micorriza surgiu a mais de 400 milhões de ano atrás, coincidente com a conquista do ambiente terrestre pelas plantas^[81]. Essa relação ancestral precede qualquer outra interação planta-microorganismo em uma era em que possivelmente não fazia sentido a palavra simbiose na relação planta-fungo, pois antes do surgimento das micorrizas, não se tem notícia da interação biotrófica microorganismo-planta^[82]. A sofisticada interação mutualística entre plantas e fungos micorrízicos, é um processo co-evolutivo que vem afetando o funcionamento e a biodiversidade ambiental^[81]. Existem vários tipos de simbioses micorrízicas, sendo a mais comum a associação simbiótica de micorrizas arbusculares (MA) estabelecida entre plantas vasculares e fungos do filo Glomeromycota^[69], exceto uma minoria não-micotrófica, pertencente às famílias *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Cyperaceae*, *Junaceae* e *Proteaceae*^[83]. É no mínimo curioso como plantas não micotróficas possuem notória habilidade para crescer e desenvolver-se em solos inférteis, refletindo como evoluíram com maior eficiência de climatização as condições adversas de solos com baixa disponibilidade de Pi^[32]. Hoje, sabe-se que mais de 80 % das plantas terrestres se associam com fungos micorrízicos arbusculares (FMA)^[79].

Simbiotróficos obrigatórios, os FMA só conseguem completar seu ciclo de vida na presença de hospedeiro, o qual fornece carboidratos e outros fatores necessários ao desenvolvimento e esporulação. O processo de infecção que ocorre quando hifas infectivas, provenientes de esporos, hifas no solo ou intra-radiculares entram em contato com as raízes das plantas, nos espaços intercelulares. Em seguida, a hifa avança para dentro das células corticais internas, onde produz ramificações dicotômicas, chamadas de arbúsculos ^[84, 85]. Embora o fungo esteja localizado fisiologicamente interno à célula do córtex, permanece separado do citoplasma da planta pela membrana peri-arbuscular vegetal, criando-se aí um espaço apoplástico entre os simbiossitos onde ocorrem as trocas de nutrientes ^[84, 85]. As hifas são prolongações funcionais do sistema radicular podendo diferenciar-se em intra e extracelulares, sendo importantes para a formação de propágulos, esporos e para agregação no solo, capazes de aumentar a disponibilidade de certos nutrientes, em particular o íon fosfato ^[84, 85].

O processo de colonização é controlado, não ocorrendo em regiões meristemáticas e em vasos condutores. Não há colonização de todas as células do córtex, nem formação de arbúsculos em todas as extremidades das hifas intra-radiculares. A diferenciação em arbúsculos requer alterações estruturais e metabólicas, tais como a deformação da parede celular fúngica, síntese de membrana plasmática, fragmentação do vacúolo, aumento do volume citoplasmático e rearranjo do citoesqueleto ^[85]. No hospedeiro ocorre a ativação e expressão de genes relacionados com absorção de Pi e transporte de sacarose, detectadas através do acúmulo de transcritos, atividade enzimática e proteínas ^[84]. Os aspectos anatômicos e fisiológicos na colonização de raízes por FMA são conhecidos, enquanto as bases moleculares desta simbiose, assim como a absorção de P pelas plantas neste sistema ecológico, não são bem compreendidas ^[67, 85].

A sequência de eventos que levam à simbiose é amplamente conservada para as diversas combinações entre fungo:planta e independente da efetividade simbiótica. Em síntese, podem ser citados os seguintes eventos do processo de colonização: (i) fase pré-

simbiótica, (ii) contato e penetração do fungo nos tecidos da raiz; (iii) proliferação intraradicular do fungo e (iv) invaginação celular e transferência de nutrientes ^[86]. Esses estágios descrevem a ordem cronológica de uma infecção primária e colonização. Uma vez que o fungo já tenha penetrado na raiz, o estabelecimento da simbiose de MA ocorre de forma contínua e em locais diversos da raiz ^[85]. O processo de reconhecimento ocorre em sintonia com as alterações morfológicas e fisiológicas de ambos os simbiontes, sugerindo que as MA são resultado de uma fina modulação de eventos de sinalização ^[85, 86].

Em várias interações simbióticas entre planta-microrganismo, a detecção ou atração ocorre antes do contato direto, este diálogo molecular desencadeia eventos essenciais ao progresso e desenvolvimento da interação física entre simbiontes ^[86, 87]. A ativação de genes específicos da simbiose parece ser consequência da percepção de sinais primários em células adjacentes ao ponto inicial de colonização, e subsequente transdução do sinal em uma cascata de eventos, que atingem o núcleo da célula a ser colonizada ^[86]. Não foi identificado ao certo o sinalizador (ou sinalizadores) primário(s) da micorrização arbuscular, ou se este é de origem fúngica ou vegetal ^[69, 86, 87].

Na fase pré-simbiótica, o esporo do fungo possui reservas de carbono que limitam seu crescimento assimbiótico, favorecendo a germinação com mínimo de energia e subsequente colonização. Eventualmente podem ocorrer germinações sucessivas na ausência ou busca do hospedeiro apropriado (receptivo) ^[85, 86]. Existem evidências da distinção pelo fungo, em certo grau, entre raízes hospedeiras ou não. Exsudatos radiculares ou compostos voláteis como o CO₂ podem inibir ou promover a germinação de esporos, demonstrando haver receptores do esporo responsivos a alterações químicas do ambiente ^[88]. O crescimento e intensa dicotomia de hifas é estimulado na presença de raiz hospedeira ou de seus exsudatos ^[86], como o fator indutor de ramificação o 5-desoxi-estrigol ^[89]. As estringolactonas, identificadas como derivados da biossíntese de carotenóides ^[90], têm sido encontradas em mono e dicotiledôneas, e suas concentrações em exsudatos radiculares coincidem com a especificidade do hospedeiro a FMA ^[89]. Outros estudos detectaram o

acúmulo de produtos da clivagem de carotenóides, como micorrícinas (pigmentos amarelos) e ciclohexenonas, em raízes micorrízicas ^[85]. Esses resultados indicam o envolvimento de derivados de carotenóides em múltiplos estádios de desenvolvimento de MA, possivelmente estimulando a ramificação de filamentos intra-radicular do fungo ^[86]. Certos compostos fenólicos, em concentrações reduzidas sem efeitos nutricionais, podem estimular ou inibir o crescimento de FMAs. A princípio os flavonóides são ativos em baixas concentrações e poderiam atuar na rizosfera de forma a controlar o crescimento e a colonização de FMA ^[84]. Entretanto, experimentos com mutantes de milho deficientes na produção de flavonóides indicaram que estes não são essenciais ao estabelecimento de micorrizas ^[88]. O envolvimento de compostos, fenólicos ou não, no processo de sinalização e colonização, não pode ser descartado e possivelmente certos genes que regulam a formação de MAs têm sua expressão regulada por um composto ou uma combinação destes ^[85].

A percepção à presença do fungo através de elicitores do microbionte desencadeia vias de sinalização na plantas que ativam respostas de defesa na planta, de forma parcial ou transiente, antes de serem suprimidas durante a simbiose com FMA ^[86, 91]. Um estudo com o promotor de um gene fúngico, um presumível fator de micorrização (*MtENDO11* ou *Myc factor*), demonstrou intensa atividade do gene repórter *GUS* em uma secção da raiz adjacente a hifas assimbióticas em intensa atividade dicotômica ^[92]. Já quando o contato e a penetração foram permitidos, a atividade do gene *GUS* restringiu-se às células infectadas e as associadas ao ponto de penetração. Esse fator *Myc* não foi encontrado em três fungos patogênicos testados ^[93]. Esses resultados indicam que na região da raiz a ser colonizada provavelmente ocorre a ativação de programa de antecipação do macrosimbionte no qual se inclui o gene *MtENOD11* ^[86].

2.5 Uso sustentável do Fósforo

Na agricultura intensiva, a produção de 6 a 9 ton ha⁻¹ de milho requer a absorção de 30 a 50 kg de P ha⁻¹ ^[94, 95], sendo dois terços deste P removidos pela ocasião da colheita. O

uso de fertilizantes fosfatados cresceu de quatro a cinco vezes entre 1960 e 2000, e projeta-se um crescimento da demanda de 20×10^6 ton ano⁻¹ até 2040 [95]. Nesse contexto, são crescentes os interesses na descoberta mecanismos mais eficientes de aquisição de P pelas plantas, fungos ou outros organismos, e explorem estas características para aprimorar a eficiência de absorção e uso de fósforo, desenvolvendo germoplasmas fosfato-eficientes em sistemas avançados que permitam maior disponibilidade de P e incorporação de áreas marginais de baixa fertilidade de P.

A resposta da planta à micorrização depende de sua eficiência de utilização do Pi do solo, que é controlada por suas características morfológicas, fisiológicas e fenológicas que refletem em sua demanda de Pi e também seu déficit por esse nutriente [85]. Estudos em Latossolo Roxo, em condições controladas mostraram que o efeito da inoculação é equivalente a 20, 30, 60, 120 e 200 kg ha⁻¹ de P respectivamente, para braquiária, milho, soja, cafeeiro e estilosantes [85]. Essas espécies apresentam eficiência decrescente da utilização de Pi e crescente magnitude de resposta a MAs. Portanto em solos tropicais, o aumento da absorção de Pi parece ser o benefício primário das micorrizas, porém não o único. A maior absorção de fósforo exerce efeitos secundários sobre outros nutrientes favorecendo as relações hídricas, tolerância ao estresse, e outros como aumento da nodulação e fixação biológica de N₂ nas leguminosas [85]. Por isso, as MAs são mais uma estratégia para alcançar a sustentabilidade dos ecossistemas e apresentam grande potencial biotecnológico. Embora exista um bom conhecimento da ação de MAs para a nutrição fosfatídica e do potencial da sua aplicação, o emprego destes facilitadores em larga escala é ainda problemática. A compreensão das respostas moleculares dessa associação simbiótica, relacionadas às respostas fisiológicas do hospedeiro, assim como o entendimento da absorção e mobilização *in situ* do P podem contribuir para desenvolvimento de estratégias e avanços para a sustentabilidade e manutenção da produtividade das culturas reduzindo a necessidade da aplicação de Pi, o que prorrogaria a vida útil desse recurso natural em vias de exaustão.

3. PERFIL FISIOLÓGICO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB EFEITO DO FÓSFORO DURANTE A SIMBIOSE COM MICORRIZAS ARBUSCULARES

RESUMO

Este trabalho examinou os efeitos da fertilização de fósforo durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares e da sua interação, no crescimento da raiz e da parte-aérea, no conteúdo de fósforo e na concentração de açúcares em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos com ou sem micorrizas (*Glomus clarum*), e sob a disponibilidade de baixo (BP) ou alto (AP) fósforo. Após 14, 30, 44 e 58 dias pós-inoculação (dpi) com *Glomus clarum* as raízes e parte-aérea foram coletadas para as análises. O BP induziu a deficiência de Pi nas plantas, micorrízicas ou não. A eficiência de absorção, indicada pelo acúmulo de Pi na parte-aérea a dada biomassa da raiz, foi igual para todos os tratamentos, sugerindo que as eficiências radicular e micorrízica da absorção de Pi foram similares, independentemente das doses de Pi. A disponibilidade de fósforo não afetou a biomassa total das plantas. Por outro lado, as plantas micorrízicas suplementadas com BP apresentaram maior crescimento da raiz e redução na parte-aérea, resultando no aumento da proporção raiz:parte-aérea. Aos 58 dpi, a glicose, frutose e sacarose presente nas folhas de plantas micorrízicas foi 3,8, 2,3 e 2,4 vezes mais concentrada do que nas não micorrízicas, respectivamente. Esses resultados sugerem que, nestas condições experimentais, o estabelecimento da simbiose não foi uma associação mutualística típica, afetando o perfil de crescimento e a alometria da cana cultivada com BP. As concentrações de fotoassimilados na folhas de planta micorrízicas indicam que houve aumentos nas taxas fotossintéticas, mas isso não resultou no maior crescimento do macrosimbionte.

ABSTRACT

This work examined the effects of phosphorus fertilization during the arbuscular mycorrhizas (AM) development and their interaction, on the root and shoot growth, phosphorus content and soluble sugars concentration in sugarcane (*Saccharum* spp.). Sugarcane plants were grown in pots with or without AM and with low or high phosphorus availabilities. After 14, 30, 44 and 58 days post-inoculation (dpi) with the fungus *Glomus clarum*, roots and shoots were harvest for analysis. The low Pi supply cause Pi deficiency in mycorrhizal or nonmycorrhizal (NM) plants. The efficiency of Pi absorption, indicated by shoot Pi accumulation in correlation to root biomass, suggested that root and mycorrhizal Pi absorption were similar, regardless of the Pi doses. Phosphorus availability did not affect the whole-plant biomass. On the other hand, mycorrhizal plants supplemented with low Pi presented the highest root growth and shoot reduction, resulting in high root:shoot ratio. At the 58 dpi, glucose, fructose and sucrose concentrations in leaves of mycorrhizal plants were 3.8, 2.3 and 2.4-fold higher than in NM plants, respectively. These results suggest that, under these experimental conditions, mycorrhizal symbiosis establishment was not a typical mutualistic association affecting sugarcane growing profile and allometry when cultivated with low Pi. The photosynthate concentration of leaves from mycorrhizal plants indicated an increase in photossynthetic rate but this did not result in higher macrobiont growth.

3.1 INTRODUÇÃO

O fósforo (Pi) é um nutriente-chave no metabolismo da cana-de-açúcar, embora seja absorvido em pequenas quantidades, quando comparado com outros nutrientes como o nitrogênio (N) e o potássio (K). Atua na formação de proteínas, processos de divisão celular, no ciclo fotossintético C₄, armazenamento de energia, desdobramento de açúcares e respiração. A partir do fornecimento da energia bioquímica do ATP, a glucose-1-fosfato e frutose são catalisadas a sacarose, a matéria-prima para a produção de açúcar e álcool ^[96].

Apesar da sua importância sócio-econômica, os estudos da associação de cana-de-açúcar com micorrizas arbusculares são escassos, embora esta simbiose ocorra em campos de produção. Alguns trabalhos recentes apresentaram importante contribuição para a genômica e proteômica sobre a interação cana-micorriza ^[97, 98], porém pouco relataram sobre a eficiência simbiótica, respostas fisiológicas à micorrização ou confrontam esses efeitos aos aspectos moleculares da interação. Os poucos estudos em cana-de-açúcar podem ser devido, principalmente, a sua baixa dependência micotrófica desta robusta espécie vegetal ^[99]. Por ser uma gramínea de ciclo longo, os efeitos da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são difíceis de ser avaliados em condições controladas até a produção ^[98]. Assim, a maioria dos estudos está relacionada à diversidade de fungos em diferentes manejos culturais. Um exemplo é o trabalho de ^[100] sobre a diversidade espécies fúngicas em cultivos de cana-de-açúcar em Minas Gerais. A adoção da queima da palhoça nos canaviais por ocasião da colheita diminui o número de esporos no solo e a diversidade dos FMAs em canaviais do Rio de Janeiro e Pernambuco ^[101].

A cana-de-açúcar é uma gramínea de importância econômica e estratégica não apenas para o Brasil. Neste capítulo da tese objetivou-se avaliar os efeitos indiretos da nutrição por fósforo em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., representada pela variedade SP80-3280) durante a simbiose com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e da

interação destes dois fatores no tempo. Os resultados foram avaliados através de medidas do acúmulo e concentração do P e demais nutrientes, eficiência de absorção e utilização do P_i , alometria entre raiz e parte-aérea, e do teor de açúcares solúveis (sacarose, frutose e glicose) na parte-aérea. Apesar da cana ser pouco micotrófica o estudo de micorrizas nesta monocotiledônea robusta pode auxiliar no entendimento da simbiose e da sua dinâmica, deste modo, poderia inspirar o desenvolvimento de estratégias para a aplicação efetiva e em larga escala das micorrizas na agricultura moderna, mantendo ou aumentando a produtividade e minimizando o impacto do manejo agrícola. A literatura sugere, de forma geral, que os fungos micorrízicos arbusculares têm efeito positivo no crescimento, absorção e ou utilização de P_i e outros nutrientes, principalmente sob efeito de baixa disponibilidade de fósforo. Assim foi realizado um experimento para avaliar a eficiência simbiótica das micorrizas na cana-de-açúcar sob efeito indireto da nutrição por P_i . As doses baixo e alto fósforo foram fornecidas de forma maximizar e minimizar a micorrização na cana-de-açúcar, respectivamente, sem um efeito direto do P_i no acúmulo de biomassa total das plantas. A hipótese inicial era observar uma resposta positiva da cana-de-açúcar durante o desenvolvimento de micorrizas arbusculares e avaliar a sua efetividade.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

A simbiose é um termo comum, que define a vida comum entre duas espécies, independente do resultado individual dessa interação. As micorrizas arbusculares (MA) são comumente conhecidas pela relação de mutualismo, que beneficia as espécies envolvidas porém, pode se expressar como agonismo (parasitismo ou predação) ou comensalismo ^[102] (Figura 1). Várias espécies de isolados de fungos exibem elevada **infectividade** (capacidade de colonização), mas podem ser pouco eficientes para a planta. As respostas da planta à colonização podem ser positivas, neutras ou negativas ^[103]. Portanto as relações entre FMAs e plantas nem sempre enquadram no seguimento do mutualismo, mas se movem dentro dos seguimentos da simbiose (Figura 1), dependendo dos genótipos simbiotes, das interações com o ambiente e das condições de crescimento. O saldo líquido da simbiose micorrízica pode variar, mesmo que exista boa compatibilidade entre parceiros, podendo não haver “benefício” em termos de crescimento para a planta. Nos sistemas naturais a sobrevivência e a fecundidade são bons indicadores da eficiência da simbiótica; nos sistemas agrícolas o acúmulo de biomassa e a produtividade são variáveis que indicam a resposta do macrosimbionte à micorrização ^[103]. Os custos da simbiose podem ser expressos em termos de fotoassimilados gastos para a manutenção dos fungos no sistema radicular ^[103, 104, 105].

		A		
		+	0	-
B	+	MUTUALISMO		
	0	COMENSALISMO	competição	
	-	AGONISMO	amensalismo	Neutralismo

Figura 1. Interação entre duas espécies (**A** e **B**) classificada quanto ao benefício (+), neutralidade (0) ou prejuízo (-) da interação. As micorrizas arbusculares englobam as relações mutualística, comensal e agonística (**NEGRITO**). Adaptado de Lewis (1985) ^[102] e Johnson, Graham e Smith (1997) ^[103].

A **especificidade hospedeira** é definida como a “capacidade de estabelecer ou não a associação” e pode ser traduzida pelo grau de compatibilidade entre o fungo e a planta hospedeira. A base da compatibilidade é determinada pela compatibilidade dos parceiros, no entanto a regulação desse mecanismo não é bem conhecida ^[85]. Esta não deve ser confundida com **efetividade** ou **eficiência simbiótica** que é a “capacidade do fungo de promover o crescimento ou outro benefício qualquer para a planta em condições definidas” envolvendo outro mecanismos ^[85]. Já os hospedeiros variam quanto ao grau de benefício da associação, principalmente em termos de crescimento, que é definido como **responsividade** ou **magnitude de resposta** da planta à micorrização ^[85].

As micorrizas são sistemas biológicos compartimentalizados capazes de responder a estímulos do ambiente e de inúmeros fatores edáficos dos componentes: ambiente, manejo,

solo, planta e fungo ^[85]. Estes componentes e as inter-relações dos diversos fatores influenciam de modo direto ou indireto na formação, funcionamento e ocorrência de micorrizas. Dentre os principais fatores podem ser citados: o ambiente do solo (pH, nutrientes, metais, temperatura e umidade); a agregação e exploração de microsítios (interações fungo-solo); a absorção de água e nutrientes, exsudatos, fotoassimilados e os efeitos fisiológicos (relação fungo-planta); suporte físico, nutrientes, água, rizodeposição, agregação e proteção (relações solo-planta); e trocas gasosas, temperatura, umidade, precipitação, luminosidade (relações planta-atmosfera); histórico da área, biota, cultivo, uso de fertilizantes, corretivos e biocidas, atividades humanas (manejo do ecossistema) ^[85].

3.2.1 Fatores que afetam as micorrizas arbusculares

3.2.1.1 Efeitos do fósforo

As micorrizas arbusculares (MAs) são geralmente inibidas sob o efeito da alta fertilidade de fósforo do solo e favorecidas pela baixa fertilidade onde a germinação e taxas de colonização são geralmente máximas. Em geral, a adição do P suficiente para o pleno crescimento da planta reduz a colonização ^[85, 106]. Para o milho, houve a redução do crescimento enquanto para a soja observou-se uma resposta positiva à colonização diante da adição de 20 mg de P kg⁻¹ solo, em função da pequena quantidade aplicada do nutriente em solo de cerrado, deficiente em P ^[85]. Já para o sorgo no cerrado, a inibição começa quando se aplicam 50 mg P kg⁻¹ solo ^[107]. Nestes exemplos, fica clara a influência da dose de P e seu efeito para diferentes culturas, desconsiderando-se outros fatores como a combinação genotípica entre simbioses e tipo de solo. Em cana-de-açúcar (SP80-3280), uma avaliação da colonização para três tipos de FMA indicou que o *Glomus clarum* proporcionou o maior contraste no percentual de colonização em relação à aplicação de 20 ou 200 mg P kg⁻¹ do substrato areia/vermiculita 2:1 (v/v) ^[108]. Para mudas de cafeeiro, a inibição de colonização inicia-se com doses acima de 50 mg de P kg⁻¹ em substrato, sendo esse efeito acentuado acima de 100 mg kg⁻¹ ^[85].

Em condições próximas do supra-ótimo para o crescimento da planta hospedeira há inibição da micorrização, não havendo efeito fungioestático sobre os propágulos do fungo na rizosfera. Nesta condição, a colonização é reduzida por mecanismos de auto-regulação da simbiose ^[85]. Quando há um aumento da concentração da disponibilidade de P_i , sua absorção pela planta e a concentração na parte-aérea, onde o nutriente atua em processos bioquímicos e ou metabólicos (fotossíntese, partição, crescimento, distribuição de fotoassimilados na planta e, possivelmente, em sinais moleculares), influenciam, e assim, ajustam de modo auto-regulatório a simbiose. Esses mecanismos são complexos e podem diferir para fungos micorrízicos, até combinações fungo-planta do mesmo tipo, dificultando as generalizações sobre os mecanismos de regulação da simbiose. Os efeitos negativos da alta disponibilidade de P_i são muito consistentes, representando quase que uma regra na ecologia da micorriza. Contudo, o mecanismo exato dessa inibição não está resolvido, e existem algumas hipóteses sobre esse fenômeno ^[85]:

- a) Inibição por lectinas presentes na raiz, as quais se ligam a carboidratos da parede do fungo inibindo seu crescimento. Sob a deficiência de P, a raiz possui alta atividade de fosfatases, capazes de formar dímeros com as lectinas, inativando-as, e favorecendo o crescimento intra-radicular do fungo. A alta disponibilidade de fósforo proporciona a baixa atividade de fosfatases, deixando as lectinas livres para atuar;
- b) Efeito da disponibilidade de P_i na permeabilidade da membrana de células radiculares do hospedeiro. O alto suprimento de fósforo favorece a biossíntese de fosfolipídios da membrana, que por sua vez afeta sua permeabilidade. Esse fato pode influenciar as trocas com o meio, reduzindo a quantidade de exsudatos (açúcares, aminoácidos, moléculas sinalizadoras) na rizosfera, que podem reduzir a germinação, crescimento micelial, e por fim reduzir a colonização. Recentemente foi proposto que a qualidade é mais importante do que a quantidade do exsudato; a identificação de certos tipos de flavonóides como

fatores ativadores da micorrização, ao contrário do preconizado pelo efeito da permeabilidade da membrana;

- c) Com base no efeito inibitório da alta concentração de açúcares sobre propágulos do fungo *in vitro* e os efeitos do Pi no metabolismo de carboidratos da planta, Siqueira (1983)^[129] formulou uma terceira hipótese para o controle do Pi na micorrização. A maior disponibilidade de P no solo e na planta poderia favorecer a maior exportação de triose-fosfato do cloroplasto para o citoplasma da folha, onde a sacarose é sintetizada e, posteriormente, translocada, via floema, até as raízes. A sacarose e ou seus derivados, quando presentes em baixas concentrações, beneficiam o crescimento do fungo conforme revelam estudos *in vitro*, mas quando em concentrações elevadas ($>4 \text{ g L}^{-1}$), torna-se inibitória ao simbionte. Admitindo-se um comportamento semelhante *in vivo* esse mecanismo atuaria na regulação da taxa de colonização das plantas.
- d) O Pi pode controlar indiretamente a colonização, atuando como um sinalizador bioquímico, atuando na modulação da supressão e indução gênica no processo de micorrização.

Conclusivamente não se sabe ao certo como o alto suprimento de Pi regula a micorrização das plantas, esse efeito embora mais evidente e estudado no P, não é exclusivo desse nutriente. O nitrogênio e outros nutrientes podem inibir a micorrização quando disponibilizados em excesso.

3.2.1.2 Efeitos de outros nutrientes

Alguns micronutrientes, como Zn, Cu, Mn e Fe, atuam diretamente sobre os propágulos dos FMAs, os quais apresentam elevada sensibilidade e assim afetam a micorrização. Os efeitos fungioestáticos da maioria dos metais são reversíveis e diferenciados sobre as micorrizas. A alteração da disponibilidade desses elementos sofre influência do pH, caracterizando um efeito indireto desse último sobre a colonização micorrízica. A aplicação conjunta de calcário e fosfato têm efeito na colonização micorrízica. No milho, a taxa de

colonização foi máxima pelo *Glomus mosseae* e *Glomus margarita* com aplicação de 240 mg kg⁻¹ de P associada a 8 e 4 meq CaCO₃, respectivamente, evidenciando diferenças específicas de ambas espécies em relação a fatores edáficos, especialmente o pH. A calagem e adição de fosfato alteram as condições químicas e biológicas do solo, afetam a microbiota, favorecendo certas espécies, portanto têm efeito sobre MAs principalmente em solos deficientes em P e ácidos, como os tropicais.

3.2.1.3 Efeito do pH

As MAs exibem grande plasticidade em relação ao pH, ocorrendo em solos com o pH variando de 3 a 10. Estudos ecológicos em solos tropicais identificaram três categorias de espécies de FMAs em relação à acidez:

- a) Predominantes em solos com elevada acidez - *Glomus daiphenum*, *Paraglomus occultum*, *Entrophosphora colombiana*, *Scutellospora* sp., *Gigaspora margarita* e *Acaulospora laevis*.
- b) Encontrado em solos pouco ácidos ou neutros - *Glomus mosseae*, *G. clarum*, *G. fasciculatum*, *G. etunicatum* e *Sclerocystis* sp.
- c) Indiferentes à acidez do solo: *Acaulospora scrobiculata*, *A. morro-wiae* e *G. agregatum*

3.2.2 Efeito no crescimento da planta hospedeira

Os efeitos das micorrizas no crescimento das plantas foram inicialmente relatados, detectados indiretamente pela redução do crescimento da plantas cultivadas em solos esterilizados, por volta de 1940 ^[85]. Nas décadas seguintes, estudos revelaram maior acúmulo de nutrientes em macieira cultivada com certos fungos (hoje pertencentes ao gênero *Glomus*), e resultados semelhantes em milho e outras espécies de plantas ^[85, 106]. No entanto, a detecção de um efeito direto no crescimento foi observada na década de 70, quando a produção de grãos de soja que chegou a ser 122, 67 e 12 % maiores do que a obtida em solos isentos de propágulos de FMAs cultivados com baixo, médio e alto Pi,

respectivamente ^[85]. Hoje, existem estudos e registros de efeitos benéficos no crescimento do hospedeiro, podendo esses valores alcançar até 8000 % ^[99]. Esta capacidade do fungo de estimular o crescimento da planta é determinada por todos os componentes da simbiose, particularmente pelo microbionte que pode apresentar graus de eficiência variáveis, que podem ser até de ineficácia ou parasitismo temporário, dependendo das características do macrobionte e das condições de crescimento ^[85]. Assim, a eficiência do fungo e a disponibilidade do Pi são determinantes na magnitude de resposta à micorrização. Como exemplo podem-se citar duas plantas contrastantes quanto a **responsividade**: o estilosantes (*Stylosanthes guanensis*) e a *Brachiaria decumbens*, dependendo esta característica, dentre outras, da exigência nutricional e da capacidade em absorver Pi. O estilosantes ampliou seu crescimento relativo de 40 % para quase 100 %, enquanto a *B. decumbens* variou por volta de 70 a 95 %, entre plantas não inoculadas e micorrízicas respectivamente, sob a baixa disponibilidade de Pi ^[85]. Neste caso, o estilosantes mostrou ser muito mais responsivo e dependente da micorrização.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal e condução do experimento

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (SP80-3280), produzidas na biofábrica do Centro Tecnológico Canavieiro (CTC), Piracicaba-SP, foram cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato estéril de areia e vermiculita (2:1; v:v) sob plástico transparente, durante 10 dias. Após a climatização, transferiram-se as plantas para vasos com 1 kg do substrato suplementados com a solução nutritiva (210 mg de N em três aplicações; e uma aplicação de: 245 mg de K; 200 mg de Ca; 48 mg de Mg; 64 mg de S; com base na solução nutritiva de Sarruge (1970) ^[113], sendo a pressão osmótica média de 0,77 e 0,79 atm para os tratamentos com alto e baixo P, respectivamente. O Fe-EDTA e micronutrientes foram aplicados via 1 mL por vaso das respectivas soluções 1000 x de Hoagland e Arnon (1950) ^[114] (micronutrientes na solução 1000x = 0,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,074 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2,86 g de H_3BO_3). O fosfato inorgânico foi aplicado nas doses de 20 ou 200 mg de P kg^{-1} , denominadas de baixo (BP) e alto fósforo (AP), respectivamente. A solução nutritiva foi aplicada uma única vez. No transplantio, inoculou-se o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* em metade das plantas de cada nível de P, originando-se dois níveis para a colonização das raízes por FMA: inoculado com *G. clarum* (Gc) ou não (ni). O inóculo ($\cong 35 \text{ cm}^3$) era constituído de solo com 500 esporos em média, hifas e fragmentos de raízes de *Brachiaria decumbens*. O experimento foi conduzido na casa de vegetação, do Laboratório de Microbiologia Molecular da Esalq-USP, a qual possui sistema de ventilação forçada programada para manter a temperatura 28°C (Figura 2). As regas utilizaram água destilada em quantidades para manter a capacidade de campo, eliminando-se o excesso por dreno no vaso. Aos 14, 30, 44 e 58 dias pós-inoculação (dpi), coletaram-se a parte aérea (PA) e raízes (R), individualmente identificadas e separadas.

O modelo experimental adotado foi de parcelas subdivididas em faixa no tempo (14, 30, 44 e 58 dpi), apresentando-se como parcelas as doses de P e sub-parcela a presença ou não do inóculo de *Glomus clarum*, arranjados num fatorial 4 x 2 x 2, totalizando 16 tratamentos. Para o primeiro período de coleta (14 dpi) foram usadas 5 plantas (repetições) para as quatro condições de cultivo: baixo P não inoculado (BPni) ou com *G. clarum* (BPGc), e alto P não inoculado (APni) ou com *G. clarum* (APGc). Para os demais períodos (30, 44 e 58 dpi) foram usadas 4 plantas.

Figura 2. Condução do Experimento I em casa de vegetação. Climatização (A) e uniformidade de plântulas de cana (SP80-3280) selecionadas (B) para experimento. Detalhe das mudas com os tratamentos baixo (C e D) e alto (E e F) fósforo, inoculadas com *Glomus clarum* (D e E) ou não (C e F). preparo dos vasos com substrato estéril areia e vermiculita (2:1) e logo após a inoculação (H). Visão geral das plantas após primeira coleta (I).

3.3.2 Coleta e processamento de amostras

No momento da coleta, imediatamente após o corte da parte aérea, a folha +2 foi separada, identificada, congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C. As raízes foram lavadas em água corrente, separando-se duas amostras de raízes finas do terço médio, uma para contagem de colonização de FMA e extração de RNA. O restante do material, raízes e parte aérea foram secos em estufa a 65° até atingirem o peso constante, cerca de 72 h, para determinação da massa seca. Cada componente seco foi moído, em moinho tipo “Willey” em peneira de 1 mm (20-40 *mesh*), identificado e acondicionado em saco de papel.

3.3.3 Taxa de colonização de raízes

As amostras do terço médio de cada raiz, aproximadamente um grama (1 g), foram preservadas em álcool 70%, extraíndo-se o conteúdo citoplasmático com 10% KOH a 90°C durante 60 min. As raízes foram submetidas a coloração com 5 % tinta azul esferográfica diluída em solução 5% de ácido acético a 90°C por 3 min, sendo em seguida lavadas em 5% ácido acético e armazenadas em lacto-glicerol ^[115]. A presença de estruturas fúngicas no tecido cortical foi contabilizada em placas reticuladas utilizando-se um microscópio estéreoecópico, conforme ^[116], e as imagens capturadas em mídia digital.

3.3.4 Determinação do teor de nutrientes

Amostras de raízes e parte aérea (0,5 g) de material seco moído foram encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Mineral e Plantas do CENA/USP para determinação do teor de macronutrientes (N, P, K, S, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn e Zn) (Malavolta et al., 1997). As concentrações de macro (g kg⁻¹) e micronutrientes (mg kg⁻¹) foram utilizadas para calcular o teor acumulado nas raízes (g R⁻¹; mg R⁻¹), parte aérea (g PA⁻¹; mg PA⁻¹) e na planta (g planta⁻¹; mg planta⁻¹).

3.3.5 Taxa de crescimento absoluto (TCA)

Estes índice avalia a produtividade primária líquida. Determinado pela soma da taxa de crescimento de diversos componentes da planta [117, 118].

$$TCA = (W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)$$

(W = massa seca total; t = tempo em dias; 1 e 2 = duas amostragens sucessivas).

3.3.6 Taxa de crescimento relativo [TCR (g g⁻¹ t⁻¹)]

Esta Taxa expressa o incremento de matéria seca, por unidade de massa inicial, em um dado intervalo de tempo [117]. Para valores médios usa-se:

$$TCR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

(Ln = logaritmo neperiano)

A TCA e TCR foram calculadas para as raízes, parte aérea e planta.

3.3.7 Razão da eficiência radicular (RER)

É definida como a quantidade de P absorvida pela parte-aérea da planta por unidade de peso da raiz (g g_R⁻¹), que representa a habilidade da planta em obter o P do solo [119].

3.3.8 Índice de utilização de P (IUP)

É definido por Siddiqi & Glass (1981) [120] como sendo o produto do “quociente de utilização” pela quantidade de biomassa total. O “quociente de utilização” ou “coeficiente de utilização” é dado pelo quociente da biomassa total por unidade de nutriente absorvido (g_{MST} g⁻¹ de P). Assim o IUP é obtido pela fórmula:

$$IUP = W^2 / P (g^2 g^{-1} \text{ de P})$$

(W = massa seca total; P = quantidade de P acumulada na planta).

Esse índice de utilização também foi calculado para o N (IUN) e o K (IUK).

3.3.9 Proporção entre raiz e parte-aérea (R:PA)

Proporção estabelecida pelo quociente entre massas da raiz e parte aérea, com base no peso fresco (R:PA_{PF}) ou massa seca (R:PA_{MS}).

3.3.10 Determinações de açúcares solúveis

As determinações de açúcares solúveis foram realizadas no Laboratório de Botânica aplicada do Instituto de Biociências (IB-USP) sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge.

Amostras com cerca de 1 g de massa fresca de folha e raiz de cana-de-açúcar foram maceradas em N líquido com auxílio de almofariz e depois liofilizadas até a secura. Uma vez desidratado, uma alíquota desse material, cerca de 20 mg de cada amostra, foi utilizada para extração de açúcares em solução de etanol 80 %. Foram feitas quatro extrações com 1 mL de etanol 80 % cada, incubando as amostras a 75-80°C por 20 min. Procedeu-se uma breve centrifugação e os sobrenadantes das 4 extrações de cada amostra foram combinados. Ao todo foram obtidos 4 mL do extrato em etanol, com base no método descrito por McCready et al. (1950)^[121]. Em seguida, realizou-se uma extração com 2,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL água mQ. Após breve agitação, as amostras em clorofórmio foram centrifugadas a 9000 *g* a 20°C por 2 min, sendo a fase líquida superior transferida para um novo tubo. Dessa forma removeram-se pigmentos, principalmente a clorofila, para evitar interferências na detecção de açúcares. O sobrenadante coletado em novo tubo, cerca de 1 mL de cada amostra, foi então liofilizado e resolubilizado em 500 µL de água mQ. Essa desidratação deve ser feita a temperatura baixa, evitando-se a caramelização de açúcares. Após a extração com clorofórmio, foi realizado um teste colorimétrico qualitativo para verificar a eficiência de extração dos açúcares com o método fenol-sulfúrico^[122].

As amostras ressuspensas em 500 µL de água, foram alíquotadas em 10 µL para serem analisadas através de uma coluna de troca aniônica CarboPak® PA-1 de 4 x 250 mm (Dionex Corporation®), em um sistema de cromatografia líquida de alta resolução de troca aniônica (HPAEC), acoplado a um detector de pulsos amperométricos (PAD/Dionex®). A fase móvel foi constituída de um gradiente de hidróxido de sódio (NaOH) a 200 mM e água com fluxo de 1 mL min⁻¹, durante 25 min. Os cromatogramas das amostras, gerados pelo

detector, foram comparados com o do padrão 5 mM de glicose (Glc), frutose (Fru) e sacarose (Sac) para determinação das concentrações ^[123].

O ajuste do método e a exploração dos cromatogramas foram realizados com auxílio do programa *PeakNet Work Station* (Dionex). Os picos correspondentes a cada um dos açúcares (Glc, Fru e Sac) foram identificados com base no tempo de detecção do padrão e tiveram suas áreas convertidas em valores numéricos com auxílio do programa *PeakNet* e transformados em concentrações de Glc, Fru e Sac na parte-aérea (aos 30, 44 e 58 dpi) e algumas amostras de raiz. Também se determinaram a concentração de açúcares redutores totais (ART) e a razão entre as concentrações de sacarose e monossacarídeos (glicose + frutose). Esses dados da parte-aérea foram submetidos à análise de variância ($n = 3$) considerando os fatores Tempo (30, 44 e 58 dpi), Dose de Pi e Presença do Fungo Micorrízico. Os tratamentos que apresentaram diferenças significativas pela análise de ANOVA foram submetidos ao teste de médias de Tukey.

3.3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados no pacote estatístico SAS, para os três fatores: dose de fósforo (DP), presença do fungo [inoculação com *G. clarum* (GC) ou não (ni)], e o tempo (T), e para as interações [DP x GC], [T x DP] e [T x DP x GC]. As variáveis massa seca total (MS), massa seca da raiz (MS_R) e da parte aérea (MS_{PA}) foram analisadas. Segundo este padrão de denominação, tem-se que a letra "R" designa as raízes e "PA" a parte aérea para as demais variáveis analisadas, enquanto a ausência destas letras designa a análise de uma variável na planta como um todo.

Portanto, as demais variáveis analisadas foram: N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn (na planta); N_R, P_R, K_R, S_R, Ca_R, Mg_R, Fe_R, Cu_R, Mn_R, Zn_R (raiz); N_{PA}, P_{PA}, K_{PA}, S_{PA}, Ca_{PA}, Mg_{PA}, Fe_{PA}, Cu_{PA}, Mn_{PA}, Zn_{PA} (parte aérea); e MA_{tx} = micorrização (taxa de colonização de raízes). As variáveis que apresentaram diferença estatística na análise de variância foram submetidas ao teste de médias de Tukey.

Realizou-se a análise de variância considerando os fatores Tempo, Dose de Pi e Presença do Fungo Micorrízico, seguido do teste de médias de Tukey.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Avaliação do estado nutricional das plantas

No primeiro período de coleta (14 d), um tempo relativamente curto considerando o ciclo da cana-de-açúcar, previu-se que as plantas cresceriam pouco, e foram obtidas cinco repetições dentro de parcelas e subparcelas. O material vegetal disponível foi suficiente para a contagem da taxa de colonização de raízes, extração de RNA e determinação do teor de P, K, S, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn. Mesmo com cinco plantas por tratamento, o material vegetal foi insuficiente para as determinações de N de todas as amostras de raízes com 14 dpi. Embora o N seja um macronutriente importante, este elemento não foi o objeto principal de estudo. Por outro lado, para os demais períodos de coleta, 30, 44 e 58 dpi, foram feitas todas as determinações, inclusive do N. Para novos experimentos, considerando plantas micropropagadas de cana-de-açúcar e períodos experimentais menores ou até 20 dias, recomenda-se pelo menos 7 plantas para aumentar a confiança dos dados e obter matéria suficiente para tantas análises como descrito no presente trabalho.

A análise de variância foi realizada para os três fatores: dose de fósforo (DP), presença do fungo [inoculação com *G. clarum* (GC)], e o tempo (T), e para as respectivas interações [DP x GC] e [T x DP] e [DP x GC x T] seguindo o delineamento fatorial de parcelas subdivididas no tempo. Exceto para o teor de P, os demais nutrientes não apresentaram efeito significativo do seu acúmulo em função dos fatores: P, Gc, "P x Gc", "Tempo x P" e "Tempo x P x Gc" (Tabela 1). Esse resultado demonstra que o estado nutricional das plantas, exceto pelo P, manteve uma tendência experimental comum, diante da imposição dos tratamentos.

Em relação ao fator tempo, houve efeito significativo do acúmulo de macronutrientes (g planta⁻¹): N, K, S, Ca e Mg (P<0,05); e para os micronutrientes (mg planta⁻¹): Fe e Zn (P<0,05), e o Cu (P<0,10) (Tabela 1). Desconsiderando o P, os demais nutrientes

apresentaram variação significativa ao longo do tempo, exceto para Mn. Esse resultado era esperado pois ocorreu uma variação das médias em função do tempo, uma vez que as plantas cresceram no período experimental absorvendo nutrientes com aumento da biomassa, acumulando MS e nutrientes. Em geral, essa variação ao longo do tempo ocorreu devido ao efeito de diluição. A fertirrigação realizada no começo forneceu os nutrientes de uma só vez, exceto para o N que foi aprofisionado no 1º, 20º e 40º dpi. No início do experimento os nutrientes estavam prontamente disponíveis via solução nutritiva, tiveram a absorção favorecida. Mesmo parcelado, detectou-se o efeito de diluição de N até o final aos 58 dpi. (Tabela 3)

A análise foliar exige maior rigor na amostragem que a análise de solo. As chamadas faixas de variação do teor disponível dos nutrientes: “baixa”, “média” ou “alta” admitem variações de até 100 % quando se usa a análise de solo para determinação de recomendações de adubação ^[124]. A folha é considerada com bom indicadora do estado nutricional da planta porém, a idade e amostragem podem refletir variações dos teores de nutrientes. Outros fatores como: genótipo, fase fenológica, desenvolvimento, tratos, estímulos bióticos e abióticos devem ser considerados como fatores potenciais de variação no teor de nutrientes.

A Tabela 1 apresenta nas duas primeiras linhas e a Tabela 2 na primeira linha, os teores de nutrientes, que em geral, são considerados adequados para a cana-de-açúcar ^[124]. Esses valores são compatíveis aos indicados pelo Instituto Agrônomo de Campinas ^[125] (Quadro 1). Deve-se ter presente, entretanto, que são valores de indicações gerais: condições de solo, clima e variedade poderão influenciar os mesmos, aumentando-os ou diminuindo-os ^[124].

Tabela 1. Efeito da nutrição por macro e micro nutrientes em função do tempo na matéria seca (MS) da Planta. ANOVA apresentando valores de quadrado médio (QM) para de cada nutriente. Os fatores e interações avaliados são os seguintes: Tempo, DP, Gc, repetições (Rep.), (Gc x DP), (Tempo x DP) e (Tempo x DP x Gc).

Variável	GL	Macronutrientes (QM)					Micronutrientes (QM)			
		N	K	S	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn
Tempo	3	9193.9667***	82600.4010***	2973.0237***	1692.9513***	20460.2901***	870.7089***	0.0787***	9.3069***	0.9286***
Gc	1	333.6109	78.1456	2.4219	8.2153	464.7797	2.7818	0.0083	0.1874	0.1314
DP	1	519.1960	487.9681	0.5094	9.2188	7.4597	7.5123	0.0242	1.1294	0.0372
Gc x DP	1	2295.0885	1.8496	50.3922	11.9629	72.9102	68.3701	0.0142	0.0161	0.1508
Tempo x DP	3	73.8670	578.8947	14.8130	12.2702	218.7251	37.2649	0.0210	0.2052	0.0079
Tempo x Gc	3	57.4194	1363.0019	21.3884	47.0362	201.7657	19.1071	0.0195	0.0749	0.0827
Tempo x DP x Gc	3	91.7786	628.1486	6.4718	1.2759	366.4075	47.2214	0.0146	0.0580	0.0187
Rep.	3	104.3501	296.9237	6.8462	27.3444	209.8546	32.5914	0.0115	0.0520	0.0040
CV (%)		13,59	14,02	13,67	24,87	17,72	33,70	97,99	20,91	46,02

*** valores significativos para $P < 0,001$, respectivamente; CV (%) = coeficiente e variação.

Tabela 2. Efeito da nutrição por fósforo (P) e da simbiose com *G. clarum* (Gc) na matéria seca (MS) e no acúmulo de P nas raízes, parte aérea e na planta. ANOVA apresenta os valores do quadrado médio (QM). Os fatores e interações avaliados são: Tempo, dose de P (DP), inoculação com *G. clarum* (Gc), repetições (Rep.), (DP x Gc), (Tempo x DP) e (Tempo x DP x Gc).

Variável	GL	MS (QM)			P acumulado (QM)		
		raízes	parte aérea	Planta	Raízes	parte aérea	planta
Tempo	3	150.9875***	171.5755***	644.0375***	89.0442***	1380.7921***	2109.2124***
Gc	1	0.3094	3.9650**	6.4961	0.6581	17.2432	10.3684
DP	1	0.4048	3.5485**	1.5531	354.3335***	10376.9875***	14537.1249***
Gc x DP	1	0.5568	1.7062	0.3150	0.6868	1.5314	0.1156
Tempo x DP	3	2.1924	0.6729	2.3031	32.0888***	909.7641***	1133.4976***
Tempo x Gc	3	0.1465	0.8929	0.6519	3.5028	18.5604	36.7441
Tempo x DP x Gc	3	4.1219	0.2864	3.4597	3.7507	12.2907	27.2451
Rep.	3	0.8004	0.3358	1.8425	0.1742	11.9945	18.7101
CV (%)		20,01	15,91	15,73	28,00	20,49	17,12

** e *** valores significativos para $P < 0,05$ e $0,001$, respectivamente; CV (%) = coeficiente e variação.

O coeficiente de variação é um número abstrato, comparável mesmo em casos de unidades diferentes, permitindo avaliar-se a dispersão dos dados por ser uma medida relativa. Em trabalhos agronômicos de campo essa medida relativa pode ser considerada alta quando acima de 30 %. Mas esta regra não é geral, por exemplo, para determinações de teores de nutrientes no solo são observadas variação de 50 % e de até 100 % ^[124].

Os coeficientes de variação (CV) apresentados para o acúmulo de nutrientes e teor de matéria seca variam entre 13,6 e 46 % (Tabelas 1 e 2), valores toleráveis para este tipo de experimento em casa de vegetação. Exceto para a variável Cu cujo CV inicial foi de 98 % devido a variações nas leituras durante a sua determinação, cujas repetições não alteraram em muito esse resultado. Para as variáveis MS na folha, raiz, parte-aérea e P acumulado os valores de CV não passaram de 28 % (Tabela 2) refletindo a robustez da análise.

Quadro 1. Exemplo prático da parte amostrada da planta, época de coleta e os níveis considerados adequados para a cultura, especificamente para o estado de São Paulo. Limitações estão atreladas ao potencial genético das plantas, e a capacidade do solo de suprir o nutriente. Instituto Agronômico de Campinas ^[125].

Nutriente	g kg ⁻¹	Nutriente	mg kg ⁻¹
N	18 – 25	Bo	10-30
P	1,5 – 3,0	Cu	6-15
K	10 - 16	Fé	40-250
Ca	2,0 – 8,0	Mn	25-250
Mg	1,0 – 3,0	Mo	0,05-0,20
S	1,5 – 3,0	Zn	10-50

Os teores de N, K, Ca, Mg e S (g kg⁻¹), e Fe, Cu, Mg e Zn (mg kg⁻¹) observados não variaram praticamente entre tratamentos, considerando os tempos individualmente. Ao longo do tempo, por efeito da diluição de nutrientes, os teores de N, K, Fe, Cu, Mn e Zn reduziram chegando aos 58 dpi, na média geral, com cerca de 40, 120, 40, 70, 10 e 65 % dos considerados adequados para a cultura da cana-de-açúcar (Tabela 3 e 4). Por outro lado, os teores de Mg e S mantiveram-se praticamente constantes, enquanto o de Ca (baixo no início) aumentou sutilmente, e ao final estes nutrientes apresentaram 195, 80 e 20 % dos valores

adequados. Esse desbalanço nutricional em termos teor de nutrientes, constante para todos tratamentos, não foi detectado estatisticamente quando se avaliou o acúmulo de cada nutriente na massa seca da raiz, parte-aérea (dados não mostrados) e da planta, ou efeitos da interação entre os fatores Tempo, Dose de P e Presença de Micorrizas (Tabela 1). Também não foram observados sintomas típicos de deficiência ou toxidez desses nutrientes nas plantas.

Os baixos teores de cálcio podem ser efeito da sua indisponibilidade temporária. Na solução nutritiva, o cátion cálcio reage com P_i para a formação do fosfato tricálcico $[Ca(PO_4)_2]$, o qual ao flocular precipita tornando o Ca não lábel, caso o pH esteja acima de 6,5. Esse fenômeno implica na menor solubilidade do P_i , sem necessariamente diminuir sua disponibilidade no solo ^[124, 126]. Outro fator que pode explicar esse comportamento é a amostragem da folha +2 (com nervura), que por ser mais nova possui menor teor de Ca do que a +3 (sem nervura central) de referência.

Em geral as variações observadas dos teores de nutrientes estão relacionadas em parte com a variedade e idade das plantas em comparação aos valores de referência, mas principalmente com o sistema de cultivo (adubação) e a amostragem. Os teores de nutrientes indicados como adequados por Raij e Cantarella (1996) ^[125] e Malavolta (1997) ^[124], foram obtidos de amostra composta da folha +1 ou +3 de cana-planta, terço médio de 20 a 30 folhas sem nervura central, cultivadas no campo (4-6 meses) com manejo voltado para máxima produção. As amostras foliares deste trabalho são provenientes do terço médio da folha +2, incluindo a nervura central, de plantas cultivadas em vasos dentro de casa de vegetação.

Os teores aqui descritos para todos os nutrientes (Tabela 3 e 4), inclusive para as doses de P_i (20 e 200 mg kg⁻¹), em plantas inoculadas ou não, foram compatíveis aos teores médios encontrados na parte-aérea de cana-de-açúcar (n= 10) sob efeito dos mesmos tratamentos com P_i e procedimento de cultivo, em vasos aos 56 dpi ^[97].

Tabela 3. Teores de macronutrientes obtidos via diagnose foliar de cana-de-açúcar do experimento com 4 tempos de coleta (dias pós-inoculação, dpi), aplicando-se as doses 20 ou 200 mg kg⁻¹ de P, baixo P (BP) e alto P(AP), respectivamente, e inoculados (Gc) ou não (ni) com o fungo *Glomus clarum*.

Tempo (meses)	Referências	N	P	K	Ca	Mg	S
----- (g kg ⁻¹) -----							
4-6	Variedades ¹	19,6-22,8	2,0-2,6	6,5-15,2	9,4-13,0	2,2-4,5	1,3-2,8
	Cultura ²	19-21	2,0-2,4	11-13	8-10	2-3	2,5-3,0
(dpi)	Tratamentos ³	----- (g kg ⁻¹) -----					
14	BPni	24,9	3,5	45,2	1,9	4,6	3,4
	BPGc	25,3	3,3	48,4	1,5	4,7	3,7
	APni	26,2	10,5	53,8	1,8	4,5	3,5
	APGc	23,3	7,3	46,5	1,4	4,1	3,0
30	BPni	16,3	1,6	38,9	1,5	4,5	3,3
	BPGc	15,7	1,4	39,1	1,1	4,9	3,2
	APni	14,4	7,6	34,9	1,7	4,6	2,8
	APGc	16,3	7,6	37,1	1,7	4,5	2,9
44	BPni	11,5	1,0	20,0	1,5	5,2	2,5
	BPGc	12,3	1,2	32,0	2,2	5,3	2,9
	APni	12,2	5,9	23,3	1,6	5,0	2,6
	APGc	13,1	6,4	25,4	2,0	5,1	3,0
58	BPni	8,5	0,8	13,7	1,9	4,5	2,0
	BPGc	7,9	0,9	16,0	1,5	4,9	2,4
	APni	7,9	5,2	14,1	2,3	5,1	2,4
	APGc	7,6	4,9	13,6	2,3	5,0	2,4
56 ⁴	BPni	9,3	1,1	29,2	2,2	2,6	2,9
	BPGc	7,9	1,1	32,5	2,6	1,8	2,6
	APni	6,7	4,9	33,8	1,9	1,5	2,4
	APGc	6,3	5,0	32,1	2,3	1,2	2,5

⁽¹⁾ Amplitude dos teores de macro nutrientes de 16 variedades de cana-planta cultivares em solo Latossolo Roxo.

⁽²⁾ Teores considerados adequados e associados com alta produtividade.

^(1;2) Análise da folha +3 de cana-planta com 4-6 meses, amostra composta de 20-30 folhas, do terço médio do limbo foliar sem a nervura central Malavolta (1997)^[124].

⁽³⁾ Média da análise foliar por tratamentos (n =4), amostra individual da folha +2 sem excluir a nervura central, coletadas até 58 dias pós-inoculação.

⁽⁴⁾ Média de 9 plantas por tratamento de ensaio experimental de 8 semanas; Souza (2006) comunicação pessoal.

Tabela 4. Teores de micronutrientes obtidos via diagnose foliar de cana-de-açúcar do experimento com 4 tempos de coleta (dias pós-inoculação, dpi), aplicando-se as doses 20 ou 200 mg kg⁻¹ de P, baixo P (BP) e alto P(AP), respectivamente, e inoculados (Gc) ou não (ni) com o fungo *Glomus clarum*.

Tempo (meses)	Referência	Fe	Cu	Mn	Zn
4-6	Cultura ¹	200-500	8-10	100-250	25-50
(dpi)	Tratamentos ²	(mg kg ⁻¹)			
14	BPni	146,0	14,7	243,8	68,0
	BPGc	312,3	15,8	243,6	102,0
	APni	211,1	17,7	252,5	124,4
	APGc	166,5	13,7	200,7	66,3
30	BPni	128,4	13,0	205,3	49,1
	BPGc	129,2	11,6	215,6	58,7
	APni	119,4	12,3	193,1	46,7
	APGc	120,0	12,1	164,1	34,2
44	BPni	150,4	9,1	201,0	38,5
	BPGc	187,3	8,7	219,2	44,6
	APni	174,6	13,2	175,2	29,1
	APGc	181,8	16,1	178,5	50,9
58	BPni	119,3	5,2	167,9	20,0
	BPGc	130,6	6,6	196,5	29,9
	APni	184,5	6,6	172,8	25,0
	APGc	123,1	6,2	148,6	20,1
56 ³	BPni	244,6	38,7	168,4	37,4
	BPGc	281,0	6,6	181,1	52,2
	APni	199,2	6,2	151,5	27,2
	APGc	280,9	5,7	162,4	24,7

⁽¹⁾ Teores considerados adequados e associados com alta produtividade. Análise da folha +3 de cana-planta com 4-6 meses, amostra composta de 20-30 folhas, do terço médio do limbo foliar sem a nervura central, Malavolta (1997)^[124].

⁽²⁾ Média da análise foliar por tratamentos (n =4), amostra individual da folha +2 sem excluir a nervura central, coletadas até 58 dias pós-inoculação.

⁽³⁾ Média de 9 plantas por tratamento de ensaio experimental de 8 semanas; Souza et al. (2006) comunicação pessoal.

3.4.2 Colonização das raízes

3.4.2.1 Micorrizas arbusculares

As plantas inoculadas apresentaram a colonização de raízes por *G. clarum* com taxas de 25, 50, 63 e 58% quando cultivadas com baixo Pi, enquanto a micorrização chegou a 0,4, 11, 21 e 34% para a dose de alto Pi, aos 14, 33, 44 e 58 dpi, respectivamente (Tabela 3).

As plantas não inoculadas não apresentaram micorrizas (Figuras 3E, 3F e 4B). Em um ensaio adicional, foram observadas taxas de colonização intra-radicular (TCI) de 64 e 39% tratadas com BP e AP aos 55 dpi, respectivamente, reduzindo para 57 e 18% aos 85 dpi (Souza & Almeida, 2004 dados não publicados). Aos 56 dpi, Takahashi (2005) ^[97] registrou as TCI de 45 e 20%, passando para 60 e 10% aos 84 dpi, para o BP e AP, respectivamente. Em um experimento similar com *G. clarum* e cana avaliando os efeitos no micro e macrosimbionte, quando da aplicação de herbicidas no solo, e observou após 56 dias uma TCI acima de 40 e 10% para o tratamento com BP e AP, respectivamente, no tratamento testemunha sem o herbicida Imazapique ^[127]. Em relação a Ametrina, a taxa de colonização das raízes foi independente do herbicida e, dependente da dose de Pi, apresentando-se 2 vezes maior nas raízes cultivadas com BP (20 mg kg⁻¹).

Em cana-de-açúcar se descreveu que a taxa de colonização intra-radicular (TCI) com o FMA *Glomus clarum* foi cerca de 33 % quando cultivada com baixo Pi. A diferença na taxa de colonização chegou a 50 % entre as doses de baixo e alto Pi (20 e 200 mg de P kg⁻¹ de substrato) após oito semanas pós-inoculação, equivalente a 56 dpi ^[108]. Este trabalho também avaliou os FMAs *Glomus etunicatum* e *Gigaspora rosea* porém, o contraste da colonização das raízes, entre as doses de Pi, não passou de 15 % para ambos os fungos ^[108]. A inoculação com *G. clarum* proporcionou o maior contraste no percentual de colonização intra-radicular em relação aos níveis de Pi (20 e 200 mg kg⁻¹). A simbiose entre *G. clarum* e *Saccharum* spp. foi favorecida sob o efeito da baixa dose Pi e inibida pelo aumento da disponibilidade de Pi, sendo esse contraste mais apropriado para os estudos da simbiose micorrízica arbuscular em cana-de-açúcar.

Todos os resultados acima apresentados foram obtidos pela utilização da mesma metodologia de inoculação e detecção da simbiose entre *Glomus clarum* e a variedade de cana SP80-3280, em tempos de coletas das plantas que variaram entre 14 a 85 dpi. Os resultados observados no presente trabalho demonstram que as diferenças da TCI, entre o tratamento com BP e AP, foram 25 e 5 vezes maiores aos 14 e 30 dpi, respectivamente, e

cerca de 2 vezes maior aos 44 e 58 dpi, enquanto essa diferença foi de 3 a 6 vezes maior aos 84 dpi, considerando-se os demais experimentos. Nestas condições experimentais a simbiose parece ter atingido uma tendência quanto a TCI, a qual manteve-se em torno de 59 e 24% para as doses BP e AP no período compreendido entre 44 a 84 dpi, respectivamente. Para o tratamento com BP a TCI parece ter alcançado um platô médio de 60%, e no tratamento com AP teve seu valor máximo de 34% aos 58 dpi, com posterior diminuição aos 84 dpi. Em parte as variações encontradas na TCI devem-se a quantidade de esporos viáveis e hifas com potencial de colonização das raízes, mas o fator mais importante é a dose de Pi e a compatibilidade entre simbiotes.

Tabela 5. Efeito da simbiose e do fósforo no crescimento das plantas. Médias do peso fresco das raízes (R) e parte aérea (PA) e da taxa de colonização intra-radicular (TCI) por micorrizas, são apresentadas as médias de quatro repetições coletadas aos 14, 30, 44 e 58 dias pós-inoculação (dpi). As doses de P (DP) foram combinadas com o a inoculação de fungo *G. clarum* (Gc) ou não (ni). A proporção entre raízes e a parte aérea (R:PA_{PF}) foi obtida com base no peso fresco.

Tempo (dpi)	DP (mg kg ⁻¹)	Inóculo (ni/Gc)	Raízes (g)	Parte aérea (g)	R:PA _{PF}	TCI (%)
14	20	ni	13,45 ± 1,18	7,08 ± 0,52	1,90	-
		Gc	8,80 ± 1,22	6,50 ± 0,85	1,35	24,96
	200	ni	7,80 ± 1,38	6,85 ± 0,57	1,14	-
		Gc	11,58 ± 1,94	7,83 ± 0,62	1,48	0,36
30	20	ni	40,40 ± 3,40	27,20 ± 1,01	1,49	-
		Gc	39,05 ± 2,68	21,13 ± 1,39	1,85	49,68
	200	ni	47,60 ± 2,43	31,53 ± 1,15	1,51	-
		Gc	41,75 ± 1,70	30,68 ± 2,03	1,36	11,30
44	20	ni	60,25 ± 7,03	35,43 ± 2,47	1,70	-
		Gc	49,30 ± 4,75	32,00 ± 0,55	1,54	63,36
	200	ni	49,15 ± 2,68	39,70 ± 1,11	1,24	-
		Gc	43,35 ± 5,41	37,38 ± 2,96	1,16	20,66
58	20	ni	79,40 ± 5,18	63,48 ± 2,45	1,25	-
		Gc	76,28 ± 8,79	47,13 ± 3,95	1,62	58,71
	200	ni	79,43 ± 2,01	59,60 ± 2,13	1,33	-
		Gc	69,50 ± 3,86	57,70 ± 3,73	1,20	34,45

Figura 3. Colonização das raízes de cana-de-açúcar pelo fungo arbuscular *Glomus clarum* (**A**, **B**, **C** e **D**). Vesícula na raiz com alto P aos 44 dias (**A**); ponta de raiz com vesículas e hifa externa tratada com BP, 58 dpi (**B**); arbúsculos em células do córtex, BP, 30 dpi (**C**); detalhe de arbúsculo em expansão em célula do córtex tratada com AP, 58 dpi (**D**); raiz não colonizada sob efeito do BP, 44 dpi (**E**); Presença do fungo quitridiomíceto, em detalhe em raiz não inoculada com *G. clarum*, 58 dpi (**F**); Taxa da colonização intra-radicular de cana-de-açúcar (SP80-3280) por *G. clarum*, média geral dos experimentos de: Souza (2002)^[108], Takahashi (2005)^[97] e Almeida (2007, este trabalho), baixo Pi (o) alto Pi (●), sendo n diferente entre experimentos ($4 < n < 10$) (**G**).

3.4.2.2 Presença do fungo quitridiomiceto

Em menos de 5 % das raízes amostradas de plantas não inoculadas, observou-se a presença do fungo quitridiomiceto. Os *Chytridiomycotas* são fungos de distribuição cosmopolita, que vivem principalmente em ambiente aquático ou no solo. São predominantemente sapróbios e muitos são parasitas endo ou epibióticos de algas, vegetais, animais e fungos. Há uma variabilidade considerável na morfologia e ecologia dos quitrídios, toda via, os encontrados apresentam estrutura unicelular, esférica, dispostos lado a lado, enfileirados, e as vezes agrupados ou isolados. Possivelmente sua presença pode ter sido favorecida pela ausência de micorrizas e excesso de umidade nas raízes não inoculadas. A sua presença não foi observada nas plantas inoculadas (95 %) com *G. clarum*. A análise do crescimento das plantas, em termos da matéria seca e teor de nutrientes (exceto o P), não demonstrou diferença entre plantas não inoculadas, para um mesmo período de coleta.

3.4.3 Absorção e uso do Fósforo

3.4.3.1 Concentração de P

No início do experimento, ocorreu uma intensa absorção de Pi uma vez que este teve a disponibilidade favorecida através da solução nutritiva aplicada no começo, assim como os demais nutrientes. De fato, as maiores concentrações de fósforo foram obtidos aos 14 dpi, tanto para as raízes quanto para a parte aérea (Figura 4 C e D). Até os 14 dpi, verificou-se a maior concentração de P (g kg^{-1}) nas raízes e na parte aérea; a partir desse momento se sucedeu uma redução dos teores de P nas plantas até o final do experimento. O efeito das doses é evidente, as plantas com baixo P têm em média 39, 20, 18 e 17% do teor de fósforo na parte-área em relação aquelas tratadas com alto P, aos 14, 30, 44 e 58 dpi, respectivamente (Tabela 3; Figura 4).

A variação na concentração de Pi na parte-área e na raiz é maior entre o 14° e 30° dpi do que entre os demais períodos, para ambas as doses, alto e baixo P. Aos 14 dpi, as concentrações registradas na parte-aérea foram 3,5, 3,3, 10,5 e 7,3 e 3,3 g de P kg^{-1} ,

passando para 1,6, 1,4, 7,6 e 7,6 g kg⁻¹ aos 30 dpi para os tratamentos BPni, BPGc, APni e APGc, respectivamente, o que representa 15, 13, 72 e 72% do valor máximo observado (10,5 g kg⁻¹ aos 14 dpi para o APni) (Tabela 3; Figura 4).

As plantas tiveram maior taxa de crescimento relativo (TCR_{PL}) entre 14 e 30 dpi (Tabela 6), supostamente devido às reservas de P na raiz e na PA em termos de concentração (g kg⁻¹) do nutriente, assim como do fornecimento completo dos demais nutrientes e do parcelamento do N. Nas raízes a redução desta concentração de Pi em relação ao tempo está relacionada aos seguintes eventos: efeito da diluição do P dado ao crescimento das plantas (i), translocação de P do sistema radicular para parte aérea da planta (ii) e manutenção da taxa de absorção de fosfato que se reflete na mínima variação da concentração a partir dos 30 dpi tanto na raiz quanto na parte aérea (iii) (Figura 4).

As plantas cultivadas com BP atingiram um valor mínimo de concentração (0,85 g kg⁻¹) na parte-aérea, sendo que a menor variação na concentração de P ocorreu entre os 30 e 58 dpi. Enquanto nas cultivadas com AP, que possuíam uma concentração de P cerca de 5 vezes maior, com um valor médio de 5 g kg⁻¹ na biomassa aérea aos 58 dpi. Assumindo-se que o fosfato absorvido pelas plantas é alocado entre raízes e parte aérea e transformado em matéria seca, conclui-se que o P tornou-se restritivo a partir dos 14 dpi para a dose menor (20 mg kg⁻¹). Aos 30 dpi, a concentração na folha dessas plantas caiu para 1,6 e 1,4 g kg⁻¹ para o tratamento ni e Gc, respectivamente. Esses valores que representaram em média 70 % do recomendado e associado a alta produtividade, o que possivelmente afetou o ritmo de crescimento dos 30 dpi em diante. Como dito anteriormente, as plantas tiveram maior salto de crescimento relativo entre os 14 e 30 dpi, que se refletiu no acúmulo de biomassa em termos gerais independentemente da dose de Pi e inoculação (Figura 4A). Este efeito no crescimento geral pode ser atribuído, em parte, à limitação de espaço a ser explorado pelas raízes no vaso, mas sobre tudo às limitações impostas no sistema de cultivo, nas quais o sistema radicular tomou todo o vaso a partir dos 30 dpi. Dos 30 até o final, as plantas sob efeito do baixo P possuíam um teor foliar 61 % inferior daquele supra-

ótimo recomendado para a cana-de-açúcar, um provável indício do estresse por P devido à dose de 20 mg de P kg⁻¹ aplicada, enquanto as sob efeito do alto P tinham 230 %.

Tabela 6. Valores médios para taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR) das raízes, parte aérea (PA) e planta, em três períodos de coleta após inoculação com fungo *G. clarum* (Gc) ou não (ni), para duas doses de fósforo (DP).

Período	DP	Inóculo	TCR			TCA		
			Raiz	PA	Planta	Raiz	PA	Planta
(DPI)	(mg kg ⁻¹)	(ni/Gc)	(g g ⁻¹ dia ⁻¹)	(g g ⁻¹ dia ⁻¹)	(g g ⁻¹ dia ⁻¹)	(g dia ⁻¹)	(g dia ⁻¹)	(g dia ⁻¹)
14 - 30	20	ni	0,09	0,09	0,09	0,16	0,20	0,36
		Gc	0,13	0,10	0,11	0,16	0,19	0,35
	200	ni	0,13	0,12	0,13	0,22	0,26	0,48
		Gc	0,11	0,11	0,11	0,19	0,23	0,42
30 - 44	20	ni	0,04	0,02	0,03	0,18	0,11	0,29
		Gc	0,04	0,02	0,03	0,15	0,08	0,23
	200	ni	0,01	0,02	0,01	0,03	0,08	0,11
		Gc	0,02	0,02	0,02	0,10	0,12	0,22
44 - 58	20	ni	0,02	0,03	0,03	0,12	0,25	0,37
		Gc	0,04	0,03	0,04	0,30	0,19	0,49
	200	ni	0,04	0,03	0,04	0,27	0,24	0,50
		Gc	0,02	0,03	0,02	0,11	0,19	0,30

Figura 4. Representação em gráficos-3D do comportamento das plantas quanto ao acúmulo de MS (**A**), micorrização do sistema radicular (**B**), e concentração de P nas raízes (**C**) e na parte aérea (**D**). Os tratamentos seguem a seguinte ordem em cada gráfico, da esquerda para direita: baixo Pi (20 mg kg⁻¹) não inoculado e com *G. clarum*; alto Pi (200 mg kg⁻¹) não inoculado e com *G. clarum*.

3.4.3.2 Conteúdo de P

A análise de variância acusa o efeito significativo do "Tempo" sobre a biomassa seca e no acúmulo de Pi na raiz, parte-aérea e planta; efeito da "Dose de P" na biomassa da parte-aérea e no acúmulo do P na raiz, PA e planta; e por fim, efeito da interação "Tempo x Dose" sobre o acúmulo de P: na raiz, PA e planta (Tabela 2).

Houve acúmulo de P nas raízes, na parte-aérea e na planta como um todo (Figura 5). Enquanto disponível o P foi absorvido pelas raízes, micorrízicas ou não. Em condições de deficiência de fósforo, as plantas utilizam estratégias para o aumento de da absorção e eficiência e uso do P. Os resultados observados sugerem que a cana-de-açúcar cultivada com 20 mg de P kg⁻¹ de substrato utilizou estratégias tais como o aumento dos sítios de absorção de fósforo na raiz e/ou da afinidade de absorção do Pi. O crescimento contínuo sob deficiência para os tratamentos com baixo P (30-58 dpi), demonstrou que a cana-de-açúcar manteve a homeostase de P, otimizando seu uso quando se observam mínimas variações na concentração de Pi, principalmente a partir dos 30 dpi (Figura 4 ; Tabela 3). Sob deficiência de P, o aumento da eficiência de absorção de Pi na rizosfera é previsto como primeiro mecanismo adaptativo às limitações do nutriente. No caso da simbiose micorrízica o fungo tem uma função especial no incremento de absorção de Pi. Em seguida, diante da continuidade de deficiência por Pi, espera-se que o crescimento do sistema radicular amplie a área de exploração do solo, ou seja, o aumento da eficiência de absorção e as reservas de P são então translocadas ou mantidas na raiz, aumentando a proporção do P acumulado na raiz, a fim de incrementar o seu crescimento, como sugere a Figura 5 para as plantas sob efeito do baixo P. Ou ainda, estes dois fenômenos poderiam ocorrer simultaneamente. Durante a micorrização o fungo exerce um papel fundamental no aumento do volume de solo explorado e na ampliação da absorção. Qual seria a via primária de sinalização que desencadeia o processo de otimização de uso do P e ou crescimento radicular simbiótico? Existem evidências que a homeostase de Pi na planta exercer função primária nessa regulação Karthikeyan et al.

(2007)^[128] acrescentam o papel dos açúcares, principalmente a sacarose, como sinalizadores complementares às respostas induzidas por estresse por fósforo. Depende do grau de severidade da deficiência de P as respostas da planta são diferentes. Uma leve deficiência de P, quando a planta possui ainda reservas induz incremento na eficiência e absorção. Esse fenômeno parece ter ocorrido até os 14 dpi, quando se nota a maior razão de eficiência radicular (RER) da absorção de P_i nas plantas cultivadas com BP, valores entre 5,2 e 7,1, comparados aos demais tempos 33, 44 e 58 dpi quando a razão variou entre 0,7 e 2,1, embora não tenha sido observada diferença significativa entre as médias (Tabela 10). Os sítios de absorção podem ser estimulados pela simbiose, sejam do fungo ou da raiz da planta, ativando a expressão de transportadores de fosfato de alta afinidade nas hifas externas, e na planta, nas raízes de absorção e outros transportadores na membrana periarbuscular onde ocorre o transporte de fosfato do fungo para a planta. Uma drástica deficiência de P, com as reservas da planta reduzindo-se, pode ativar vias de sinalização para re-alocação de P da parte-aérea para raiz, promovendo o crescimento do sistema radicular, aumentando o volume de solo explorado. O fungo neste estudo com cana-de-açúcar pode ter atuado como dreno. O consumo de reservas de P, poderia ter ativado uma resposta de crescimento do sistema radicular? Sim. E, portanto aumentando o acúmulo de biomassa seca radicular-micorrízica devido ao crescimento da micorriza, raiz e fungo.

Figura 5. Percentual do total de fósforo acumulado na raiz (preto) e parte aérea (cinza). Os diagramas superiores e inferiores representam as doses de Pi baixa (20 mg kg⁻¹) e alta Pi (200 mg kg⁻¹) aplicadas no substrato, respectivamente. O preto liso indica raízes não inoculadas (*ni*) e o preto-malhado a presença de micorrizas (*Gc*), ao longo do tempo, em dias após a inoculação (*dpi*). As médias por tratamento do P acumulado aos 58 dpi na parte-aérea e na raiz estão indicadas no canto superior e inferior de cada diagrama, respectivamente.

3.4.4. Acúmulo de biomassa das Plantas

No início do experimento, as plantas foram climatizadas e uniformizadas quanto ao seu tamanho e peso fresco. As plântulas selecionadas apresentavam tamanhos médios entre 10 a 12 cm para a parte-aérea e cerca de 3 cm de raiz (Figura 2 B). Na amostragem de 10 indivíduos, a massa fresca média foi de 2,3 g para parte aérea e 1,0 g para a raiz, totalizando 3,3 g em média por planta. Em termos de biomassa fresca, a média do

experimento mostrou maior resposta de crescimento, cerca de 4 vezes, entre os períodos de 0-14 e 14-30 dpi, enquanto nos demais períodos, de 30-44 e 44-58 dpi, apresentaram um crescimento de 1,2 a 1,5 vezes, respectivamente, corroborando com os dados observados no crescimento reativo e acúmulo de biomassa (Tabela 5) .

Aos 14 dpi, o maior valor de massa fresca total (MF_T) foi de 20,5 g para as plantas do tratamento com BPni, seguido do tratamento com APGc (19,4 g), enquanto os tratamentos com BPGc e APni tiveram as menores médias, cerca de 15 g cada. Para a parte aérea das plantas, obteve-se média geral de 7,1 g, sem diferenças entre tratamentos. A maior massa média foi 7,8 g e a menor 6,5 g para os tratamentos com APGc e BPGc, respectivamente. Por outro lado, a raiz obteve médias de 11,6 e 13,5 g para o APGc e BPni e, valores 34 % menores em média para APni (7,8 g) e BPGc (8,8 g). Esses resultados se refletiram na proporção $R:PA_F$ expressa em termos da massa fresca, cujos valores máximos foram 1,9 e 1,5 para os tratamentos BPni e APGc seguido dos tratamentos BPGc (1,4) e APni (1,1) (Tabela 5).

Aos 30 dpi, a média MF_T das plantas tratadas com AP ($ni = 79,1$ g; $Gc = 72,4$ g) foi superior do que a média das plantas com BP ($ni = 67,6$ g; $Gc = 60,2$ g). Em relação a parte aérea, a média de biomassa fresca foi 31,2 g para a dose com AP (ni e Gc), 27,2 g para o BPni e o menor valor foi para o BPGc, média de 21,1 g. Já na raiz, a maior média foi de 47,6 g para o tratamento com APni, enquanto os demais tratamentos apresentaram um valor médio de 40,4 g, sem praticamente variar entre si. Esses resultados alteraram o perfil da proporção $R:PA$ dos tratamentos a partir dos 30 dpi (Figura 6). O valor máximo de 1,9 alcançado pelo tratamento com BPGc, seguido pelos demais tratamentos com a $R:PA_{MF}$ de 1,5 em média (Tabela 5).

No período de 44 dpi, os tratamentos com AP obtiveram maior média MF_{PA} em relação aos tratamentos sob efeito do BP. O maior valor obtido foi para as plantas sob efeito do APni (39,7 g) e o menor para as do BPGc (32,0 g). Já na raiz, o maior crescimento em termo de massa fresca foi observado no cultivo com BPni ($MF_R = 60,3$ g), seguido das

plantas cultivadas com BPGc e APni, com médias iguais em 49 g e, apresentando menor crescimento o APGc, com média de 43,3 g. Esses valores representaram mudanças na alometria das plantas, alterando a proporção R:PA apresentado valores de 1,7 e 1,5 para os tratamentos com BP, ni e Gc, respectivamente, e 1,2 para ambos os tratamentos com AP (ni e Gc).

No final, aos 58 dpi, a média da MF_{PA} das plantas sob cultivo com BPGc foi de 47,1 g a menor registrada, comparada com os demais tratamentos que tiveram 57,7, 59,6 e 63,5 g para o APni, APGc e BPni, respectivamente. Quanto a média da MF_R , o tratamento com BPGc obteve 76,3 g, próximo da média 79,4 g, obtida pelos tratamentos BP e AP não inoculados, ao passo que o APGc teve o menor valor de média, 69,5 g. O que resultou no aumento da proporção R:PA chegando a 1,6 para o BPGc, diferenciando-se dos demais tratamentos que obtiveram uma razão de 1,25 em média.

Ao longo do período experimental houve um aumento da biomassa fresca no sistema radicular de forma contínua. Na parte aérea (PA) se observa este fenômeno, porém com menor intensidade de crescimento sob influência do BP. Para as plantas cultivadas com BP e inoculadas com *Glomus clarum* (BPGc), o efeito do P interferiu no crescimento da parte aérea, que obteve 7, 21, 32 e 47 g, correspondendo a 96, 67, 80 e 78 % da máxima massa fresca alcançada pelas plantas tratadas com APni aos 14, 30, 44 e 58 dpi, respectivamente (Tabela 5). O BP não foi limitante para o crescimento total das plantas, mas estimulou o maior crescimento das raízes em relação a PA principalmente a partir dos 30 dpi em termos de peso fresco.

Após a climatização e uniformização para o experimento, foi observado uma média de peso fresco de 3,3 g por planta. Considerando essa uniformidade como o início do experimento, aos 14 dias as plantas cultivadas com baixo fósforo e não inoculadas (BPni), atingiram maior acúmulo de biomassa seca da planta (MS_T), chegando a 1,74 g em média de massa seca, seguidas pelas plantas sob alto Pi, correspondendo a 82,8 % desse valor para as micorrízicas e 68,4 % as não inoculadas. Por último, com a menor biomassa média (1,14 g),

as plantas inoculadas com FMA sob o baixo Pi corresponderam a 65,5 % da média máxima da massa seca.

Ainda aos 14 dpi, a relação raiz:parte-aérea em termos de massa seca, variou entre 0,76 a 0,79 para os tratamentos com BPni e com alto fósforo (AP), sendo que as plantas sob o BPGc obtiveram a menor razão R:PA igual a 0,48, um valor 37 % menor que a média (Tabela 7). Logo, esse resultado evidencia que as plantas sob BPGc alcançaram a menor MS média e a menor proporção R:PA aos 14 dpi, enquanto as plantas com BPni, que atingiram a maior massa seca, tiveram uma razão R:PA (0,76) congruente com as plantas tratadas com AP (0,77-0,79) (Tabela 7).

Aos 30 dpi, o tratamento com APni obteve o maior acúmulo de MS_T, com média de 8,92 g, seguida de perto pelo tratamento com APGc, com 91 % desse valor. As plantas cultivadas com BP tiveram médias menores de MS_T, atingindo 7,5 e 6,7 g para as não inoculadas e micorrízicas respectivamente, ou seja, 84 e 75 % do valor máximo. A razão raiz:parte-aérea foi de 0,84 e 0,77 em média para os tratamentos com AP e BP, respectivamente. Entre os 14 e 30 dpi, as raízes micorrízicas e tratadas com BP passaram de 32 % para 43 % da MS total compatível com a média geral (45 %), aos 30 dpi. Similarmente, a razão R:PA inicial de 0,48 passou para 0,77 nas plantas com BPGc, aproximando-se da média geral 0,81. Assim as plantas cultivadas com BPGc, embora tenham tido a menor média de MS total, desenvolveram o sistema radicular micorrízico cujo percentual em relação a MS total é equivalente aos dos demais tratamentos. Em consequência, houve um incremento na proporção R:PA, igualando-se ao tratamento com BPni e aproximando-se dos tratamentos com AP.

Aos 44 dpi, o acúmulo de MS total foi de 11,5, 9,9, 10,5 e 11,2 para os tratamentos BPni, BPGc, APni e APGc, apresentando uma amplitude máxima de 15 %. Os tratamentos com BP apresentaram maior percentual de raiz na MS total (50 %) em comparação aos tratamentos com AP (44 %). As médias da razão R:PA foram 1,01 e 1,04 para as plantas com BPni e BPGc contra 0,74 e 0,79 das plantas tratadas com APni e APGc, respectivamente.

No último período, aos 58 dpi, não houve diferença significativa na MS total entre os tratamentos. O valor médio máximo da MS total foi 17,6 g para o APni e o mínimo 15,4 g para APGc, enquanto os tratamentos com baixo fósforo obtiveram médias de 16,7 g. As raízes chegaram a um percentual de 43, 45 e 47 % da MS total para os tratamentos BPni, APni e APGc respectivamente, enquanto no tratamento BPGc as raízes atingiram o valor máximo de 55 % da MS total. A proporção raiz:parte-aérea das plantas BPGc chegou ao valor de 1,23 superando os demais tratamentos que tiveram proporções R:PA abaixo de 0,90.

Figura 6. Crescimento vegetal em termos de acúmulo de matéria seca (MS, colunas) total e proporção raiz:parte-aérea (R:PA, linhas). As colunas brancas representam a menor dose de Pi (BP) e as cinzas escuras a alta dose (AP), enquanto as listras diagonais indicam a presença de micorrizas. As barras simbolizam o erro padrão da média (4 repetições), em cada tempo (dias pós-inoculação, dpi).

Tabela 7. Médias de matéria seca (MS) e acúmulo de fósforo (P) nas raízes (R), parte aérea (PA) e na planta (PL). A relação entre as raízes e parte aérea ($R:PA_{MS}$) foi obtida com base na MS de cana-de-açúcar cultivada com duas doses de fosfato (DP). Valores médios de 4 plantas coletadas aos 14, 30, 44 e 58 dias pós-inoculação (dpi), para duas doses de P (DP) e a presença do fungo micorrízico (Gc) ou não (ni).

Tempo (dpi)	DP (mg kg ⁻¹)	Inóculo (ni/Gc)	MS			$R:PA_{MS}$	P acumulado		
			Raízes (g)	Parte aérea (g)	Planta (g)		Raízes (g R ⁻¹)	Parte aérea (g PA ⁻¹)	Planta (g PL ⁻¹)
14	20	ni	0,75 ± 0,14	0,99 ± 0,13	1,74 ± 0,20	0,76	1,23 ± 0,14	3,38 ± 0,17	4,61 ± 0,11
		Gc	0,37 ± 0,02	0,77 ± 0,02	1,14 ± 0,04	0,47	0,66 ± 0,08	2,61 ± 0,53	3,28 ± 0,56
	200	ni	0,53 ± 0,20	0,67 ± 0,06	1,19 ± 0,24	0,79	2,11 ± 0,48	6,93 ± 0,52	9,04 ± 0,64
		Gc	0,63 ± 0,09	0,82 ± 0,13	1,44 ± 0,20	0,77	2,95 ± 0,82	6,16 ± 1,77	9,11 ± 2,55
30	20	ni	3,29 ± 0,42	4,21 ± 0,23	7,50 ± 0,62	0,78	2,93 ± 0,20	6,61 ± 0,03	9,54 ± 0,23
		Gc	2,91 ± 0,59	3,79 ± 0,46	6,70 ± 1,02	0,77	2,63 ± 0,44	5,24 ± 0,51	7,87 ± 0,84
	200	ni	4,11 ± 0,19	4,81 ± 0,20	8,92 ± 0,39	0,85	10,74 ± 1,36	36,53 ± 3,14	47,27 ± 3,02
		Gc	3,69 ± 0,02	4,44 ± 0,09	8,12 ± 0,11	0,83	11,63 ± 1,15	33,59 ± 1,43	45,23 ± 2,55
44	20	ni	5,79 ± 0,96	5,76 ± 0,58	11,55 ± 1,47	1,00	3,56 ± 0,55	5,71 ± 0,53	9,27 ± 1,04
		Gc	5,04 ± 0,42	4,86 ± 0,34	9,90 ± 0,64	1,04	4,08 ± 0,42	5,74 ± 0,31	9,81 ± 0,57
	200	ni	4,54 ± 0,31	5,99 ± 0,21	10,53 ± 0,41	0,76	7,79 ± 0,57	35,00 ± 1,77	42,79 ± 1,99
		Gc	5,15 ± 0,34	6,09 ± 0,54	11,24 ± 0,44	0,85	10,02 ± 1,27	38,72 ± 2,98	48,74 ± 2,39
58	20	ni	7,50 ± 0,73	9,25 ± 0,62	16,75 ± 1,33	0,81	3,94 ± 0,61	7,53 ± 0,47	11,47 ± 0,95
		Gc	9,20 ± 0,53	7,49 ± 0,57	16,70 ± 0,81	1,23	4,27 ± 0,43	6,77 ± 0,32	11,05 ± 0,20
	200	ni	8,26 ± 0,40	9,32 ± 0,63	17,59 ± 0,99	0,89	8,83 ± 0,76	47,86 ± 3,07	56,69 ± 2,91
		Gc	6,67 ± 0,17	8,76 ± 0,31	15,44 ± 0,41	0,76	6,69 ± 0,41	42,47 ± 4,34	49,16 ± 4,58

Tabela 8. Valores de biomassa e fósforo acumulado encontrados na raiz, parte-aérea e planta de cana-de-açúcar. Médias dos tratamentos do delineamento fatorial (4 x 2 x 2) considerando os fatores Tempo em dias pós-inoculação (dpi), Dose de Pi (20 ou 200 mg kg⁻¹) e a Presença do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* inoculado (Gc) ou não (ni).

Tempo (dpi)	Dose P (mg kg ⁻¹)	FMA (ni/Gc)	Raiz		Parte-aérea		Planta	
			MS		MS			
			(g)					
58	200	Gc	6,67	bcd	8,77	a	15,44	a
		ni	8,27	ab	9,33	a	17,59	a
	20	Gc	9,20	a	7,49	ab	16,70	a
		ni	7,51	abc	9,25	a	16,76	a
44	200	Gc	5,16	def	6,09	bc	11,25	b
		ni	4,54	defg	5,99	bc	10,53	bc
	20	Gc	5,04	def	4,87	cd	9,91	bcd
		ni	5,79	cde	5,77	bc	11,56	b
30	200	Gc	3,69	efg	4,44	cd	8,12	bcd
		ni	4,11	efg	4,81	cd	8,92	bcd
	20	Gc	2,91	gh	3,79	d	6,70	d
		ni	3,29	fg	4,21	cd	7,50	cd
14	200	Gc	0,63	i	0,82	e	1,44	e
		ni	0,53	i	0,67	e	1,19	e
	20	Gc	0,37	i	0,77	e	1,14	e
		ni	0,75	hi	0,99	e	1,74	e
Tempo (dpi)	Dose P (mg kg ⁻¹)	FMA (ni/Gc)	P acumulado					
			(mg raiz ⁻¹)	(mg parte-aérea ⁻¹)		(mg planta ⁻¹)		
58	200	Gc	6,69	cde	42,47	ab	49,16	ab
		ni	8,83	abc	47,86	a	56,69	a
	20	Gc	4,27	ef	6,77	c	11,05	c
		ni	3,94	ef	7,53	c	11,47	c
44	200	Gc	10,02	abc	38,72	ab	48,74	ab
		ni	7,79	bcd	35,01	b	42,80	b
	20	Gc	4,08	ef	5,74	c	9,81	c
		ni	3,56	ef	5,71	c	9,27	c
30	200	Gc	11,63	a	33,59	b	45,23	b
		ni	10,74	ab	36,54	b	47,27	ab
	20	Gc	2,64	f	5,24	c	7,88	c
		ni	2,93	f	6,61	c	9,54	c
14	200	Gc	2,95	f	6,16	c	9,11	c
		ni	2,30	f	6,93	c	9,04	c
	20	Gc	0,67	f	2,56	c	3,28	c
		ni	1,23	f	3,38	c	4,61	c

Médias (n=4) seguidas pela mesma letra indicam diferença não-significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

As plantas com baixo fósforo começaram o experimento com menor valor de MS total, chegando ao final com uma biomassa equivalente aos demais tratamentos. Esses dados sugerem que o baixo fósforo foi suficiente para suprir as necessidades de crescimento da plantas de forma equivalente à dose de alto Pi. Em parte, o prolongamento das raízes por desenvolvimento de hifas internas (e externas) aumentou a biomassa e volume de substrato explorado das raízes dos tratamentos com *G. clarum*. As diferenças observadas no aumento da biomassa do sistema radicular também são resultantes da alocação de carbono e nutrientes na raiz, uma resposta comum à deficiência de P. Soma-se a este fato, nas plantas micorrízicas sob efeito do baixo fósforo, o crescimento do fungo possivelmente atuou como um dreno, demandando energia para o crescimento e desenvolvimento de estruturas fúngicas (arbúsculos, hifas e vesículas), mesmo com o volume de substrato sendo limitante, principalmente após 30 dpi. Assim, não havendo mais volume de solo a ser explorado e a fonte de nutrientes sendo limitada, possivelmente o fungo prevaleceu em crescimento, desenvolveu-se, acumulou MS e afetando a proporção R:PA, principalmente aos 44 e 58 dias.

3.4.5 Taxa de crescimento relativo (TCR)

Esse índice expressa o incremento na massa seca por unidade de massa inicial. No período entre 14 e 30 dpi, a taxa de crescimento relativo, considerando a planta como um todo, foi maior para o tratamento com APni ($TCR_{PL} = 0,13 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Já o tratamento BPni obteve o menor valor ($TCR_{PL} = 0,09 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e as plantas inoculadas com FMA, para ambas as doses (baixo e alto Pi), apresentaram um crescimento relativo de $0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Embora esses valores da TCR_{PL} não sejam muito contrastantes, os resultados sugerem que: (i) as plantas tratadas com AP e não inoculadas com FMA produziram uma TCR_{PL} maior possivelmente favorecidas pela nutrição mineral com o AP, sem arcar com os custos energéticos da colonização das raízes por FMA; (ii) as plantas com baixo P e não inoculadas com FMA tiveram seu crescimento reduzido diante da baixa dose desse nutriente; (iii) as

plantas micorrízicas, apesar do custo energético da simbiose, alcançaram uma TCR_{PL} 15 % menor do que as plantas com APni, no período de 14 a 30 dpi. Em paralelo a esse resultado, a TCR_R foi maior para as plantas tratadas com APni, cujo valor foi $0,13 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, enquanto no APGc foi de $0,11 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, havendo uma redução de 15 % na TCR_R , não atingindo maior crescimento, pois o alto Pi supostamente inibiu o desenvolvimento de micorrizas. Nas plantas com BPGc a TCR_R foi $0,13 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ igual ao valor das plantas com APni, sendo provável que a baixa disponibilidade de Pi aliada ao processo simbiótico desencadearam uma maior TCR_R em relação às raízes com BPni. No intervalo entre 14 e 30 dpi observou-se a maior TCR do experimento quando comparada com os outros dois intervalos 30-44 e 44-58 dpi, considerando-se raízes, parte aérea ou mesmo toda a planta (Tabela 6).

Nos outros dois períodos do experimento, entre 30-44 e 44-58 dpi, a TCR_{PA} foi igual para todos os tratamentos, $0,02$ e $0,03 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para os respectivos períodos. No entanto, no período de 30-44 dpi, esse índice de crescimento nas raízes com baixo P ($0,04 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi pelo menos duas vezes maior do que nos tratamentos com alto Pi, cultivado com micorrizas ($0,02 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ou sem ($0,01 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Já entre os 44-58 dpi, as raízes com BPGc cresceram tanto quanto as raízes com APni ($0,04 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), enquanto as os tratamentos com APGc e BPni atingiram metade desse valor ($0,02 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

3.4.6 Eficiência de absorção e utilização do Fósforo

A análise de variância para as variáveis razão de eficiência radicular (RER) e do índice de utilização (IU) de nutrientes acusou efeito significativo do tempo para os nutrientes N, P e K. Apenas para o P, foi observado efeito da dose na RER e IUP, e efeito da interação "Tempo x DP" para o IUP (Tabela 9).

De modo geral, a razão de eficiência radicular de absorção do N, P e K mostrou uma variação ao longo do tempo (Tabela 10), com os maiores valores obtido aos 14 dpi e conseqüente decréscimo da RER até os 58 dpi. Esse comportamento observado denota o efeito da diluição no teor de nutrientes e do acúmulo de biomassa ao longo do tempo. Para o

N e o K a RER teve maior variação entre o 14º e 30º dpi onde, de modo geral, verifica-se que as médias aos 14 dpi diferem amplamente das encontradas aos 30, e gradativamente mais das verificadas entre 44 e 58 dpi.

Para o P a RER média do tratamento tratadas com APni foi significativamente maior do que todas as demais. Verifica-se, nesse caso, o efeito da nutrição com alto P, pois esse tratamento combinou baixa biomassa radicular com o maior acúmulo de P aos 14 dpi, traduzindo-se em alta eficiência radicular dessas plantas (Tabela 10). A análise de ANOVA indica efeito do Fósforo para a RER, e é notória a diferença entre os tratamentos com alto e baixo Pi, principalmente aos 30, 44 e 58 dpi. Não foi observado efeito significativo da micorrização na eficiência de absorção do Pi, para a mesma dose de fósforo para os demais tratamentos aos 30, 44 e 58 dpi. Esse resultado sugere que, nestas condições experimentais, o crescimento significativo das raízes micorrízicas e tratadas com baixo Pi, não proporcionou maior acúmulo de fósforo na parte aérea ou na planta do que as não inoculadas. A cana-de-açúcar demonstra ser uma gramínea robusta capaz acumular a mesma quantidade de fósforo independentemente da simbiose em condições de baixa disponibilidade do mesmo.

Aos 58 dpi, não há diferenças significativas entre a RER dos tratamentos. Observa-se nas plantas cultivadas com alto Pi, que as micorrízicas continham mais Pi na raiz (2,95 mg raiz⁻¹), do que as não inoculadas (2,30 mg raiz⁻¹). Essa diferença inicial que passou a ser significativa aos 58 dpi, quando as raízes colonizadas pelo fungo continham 6,7 mg raiz⁻¹, ou seja 76 % a menos Pi nas raízes do que as não micorrízicas (8,8 mg raiz⁻¹). Embora a RER seja a mesma e não tenha sido observada diferença significativa no IUP entre micorrízicas ou não tratadas com AP aos 58 dpi, percebe-se que nesta condição a simbiose favorece o maior acúmulos de reservas na parte aérea o que ser benéfico, a longo prazo, para manter a homeostase de P na planta (Tabela 10 e 8, Figura 5).

O índice de utilização (IU) de um nutriente está relacionado com a capacidade de crescimento em termos biomassa em relação do conteúdo total destes nutriente na planta. A medida que um nutriente se torna escasso ou em doses limitantes, maior será o esse índice

de utilização deste sempre que haja incremento na biomassa. Em outras palavras, considerando-se plantas com o mesmo acúmulo de massa seca, aquelas sujeitas a baixa disponibilidade ou menor dose de um nutriente, terão maior coeficiente de utilização desse.

Ao analisar o IU do N, P e K, apenas o fósforo obteve efeito da Dose de P e da interação "Tempo x DP", enquanto o efeito do Tempo foi observado para os três nutrientes (Tabela 9). Para o N e o K esse coeficiente de utilização foi crescente dos 14 aos 58 dpi, sendo que no último período, sob efeito da limitação da disponibilidade de nutrientes, obtiveram-se IUN e IUK estatisticamente diferentes em relação aos demais tempos, 14, 30 e , 44 dpi. Para estes dois macronutrientes não foram observadas diferenças de medias entre tratamentos em cada um dos tempos. Para o N fornecido em três parcelas, não há diferenças entre 14 e 44 dpi, já para o K observa-se uma variação maior entre os tempos, mas não há efeito da micorrização ou das doses de Pi a cada período. Para o P, observa-se o efeito significativo das doses aplicadas, alto e baixo Pi, principalmente aos 44 e 58 dpi, enquanto aos 14 e 30 dpi, as diferenças observadas entre o AP e BP não são significativas.

Tabela 9. Efeito da nutrição por fósforo (DP) da interação simbiótica entre cana-de-açúcar e o fungo *Glomus clarum* (Gc) na razão de eficiência radicular (RER) e do índice de utilização (IU) de N, P e K. ANOVA apresenta os valores de quadrado médio (QM) para os fatores e interações: Tempo, dose de P (DP), inoculação com *G. clarum* (Gc), (DP x Gc), (Tempo x DP), (Tempo x DP x Gc) e repetições (Rep.).

Variável	GL	RER ¹			Índice de utilização ²		
		N	P	K	IUN	IUP	IUK
Tempo	3	3728.8707***	170.8388***	21119.8567***	18,6076***	643.0466***	7.7916***
Gc	1	5.0400	19.6249	15.1612	0,0079	5.1756	0.0722
DP	1	9.0000	793.5489***	19.7247	0,0087	1151.5842***	0.0390
DP x Gc	1	186.4590	36.1501	1961.4933	0,6030	2.9155	0.0078
Tempo x DP	3	68.7768	10.9667	155.7753	0,0777	283.6002***	0.0157
Tempo x Gc	3	11.5929	33.0452	100.9553	0,0720	4.7233	0.0143
Tempo x DP x Gc	3	419.7943	59.4158	2341.8072	0,7219	6.0021	0.0488
Rep.	3	82.3306	14.7226	557.3211	0,2730	3.5665	0.0738
CV (%)		50,87	71,18	44,44	21,08	32,96	26,21

⁽¹⁾ RER - definida como a quantidade do nutriente absorvida pela parte-aérea da planta por unidade de peso da raiz (g g_R⁻¹)

⁽²⁾ IU - produto do "quociente de utilização" pela quantidade de biomassa total (IUP = W² / n (g² g⁻¹ de P) (W = massa seca total; n = quantidade do nutriente acumulada na planta)).

Tabela 10. Valores “índice de utilização” e “razão de eficiência radicular” (RER) para nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). As médias estão ordenadas em função dos tratamentos e do resultado do testes de Tukey para facilitar a visualização das diferenças estatísticas dos tratamentos. O tempo está em ordem cronológica decrescente e crescente para o “índice de utilização de nutrientes” e RER respectivamente. Tempo em dias pós-inoculação (dpi), Dose de Pi (20 ou 200 mg kg⁻¹) e da Presença do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Glomus clarum* inoculado (Gc) ou não (ni).

Tempo (dpi)	Dose (mg kg ⁻¹)	FMA (ni/Gc)	N		P IU ¹		K	
			-----		(g ² g ⁻¹)		-----	
58	200	Gc	2,64	a	5,03	cdef	1,51	a
		ni	3,16	a	5,49	cdef	1,67	a
	20	Gc	3,49	a	22,74	a	1,50	a
		ni	2,61	a	24,56	a	1,66	a
44	200	Gc	1,16	b	2,37	def	0,63	bc
		ni	1,12	b	2,60	def	0,65	bc
	20	Gc	1,07	bc	10,05	b	0,49	bcd
		ni	1,24	b	14,40	b	0,82	b
30	200	Gc	0,67	bc	1,47	def	0,30	cde
		ni	0,85	bc	1,69	def	0,36	cde
	20	Gc	0,57	bc	5,77	cde	0,25	cde
		ni	0,60	bc	5,96	cd	0,27	de
14	200	Gc	0,10	d	0,28	ef	0,04	de
		ni	0,12	d	0,17	f	0,03	de
	20	Gc	-	-	0,35	ef	0,02	e
		ni	0,15	bc	0,68	def	0,05	de
Tempo (dpi)	Dose (mg kg ⁻¹)	FMA (ni/Gc)	RER ²		-----		-----	
			-----		(g g ⁻¹)		-----	
14	20	ni	37,87	ab	5,25	b	84,44	abc
		Gc	53,89	a	7,10	b	124,67	ab
	200	ni	51,56	a	21,76	a	132,39	a
		Gc	30,41	abc	9,15	b	79,29	abcd
30	20	ni	21,54	bc	2,10	b	65,84	bcd
		Gc	21,91	bc	1,98	b	69,04	abcd
	200	ni	16,88	bc	8,90	b	54,40	cd
		Gc	19,56	bc	9,11	b	59,62	cd
44	20	ni	12,16	bc	1,03	b	31,77	cd
		Gc	12,02	bc	1,17	b	40,84	cd
	200	ni	16,15	bc	7,76	b	38,81	cd
		Gc	15,89	bc	7,72	b	37,68	cd
58	20	ni	10,52	bc	1,02	b	22,84	cd
		Gc	5,68	c	0,74	b	18,52	d
	200	ni	8,15	c	5,16	b	19,13	d
		Gc	10,99	bc	7,17	b	27,75	cd

Médias (n=4) seguidas pela mesma letra indicam diferença não-significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

⁽¹⁾ RER - definida como a quantidade do nutriente absorvida pela parte-aérea da planta por unidade de peso da raiz (g g⁻¹)

⁽²⁾ IU - produto do “quociente de utilização” pela quantidade de biomassa total (IUP = W² / n (g² g⁻¹ de P) (W = massa seca total; n = quantidade do nutriente acumulada na planta)).

3.4.7 Efeito simbiótico a e proporção raiz:parte-aérea

A colonização das raízes pelo FMA que receberam 20 mg kg^{-1} de P, teve uma fase de micorrização exponencial acentuada atingindo o máximo de 63% de colonização aos 44 dpi, decaindo para os 59% aos 58 dias. Neste período, entre 44 a 58 dpi, também se encontra o maior contraste na colonização de raízes (42 %), entre as plantas sob efeito das doses de baixo e alto P. Aos 30 dpi, este contraste é de 38 %, enquanto aos 14 e 58 dpi tem-se apenas 24 % de diferença entre plantas adubadas com baixo e alto P.

Os resultados a seguir sugerem que o fósforo aplicado e a micorrização influenciaram no crescimento do sistema radicular, afetando a proporção entre raízes e parte aérea. Para as plantas sob BPGc, a razão $R:PA_{PF}$ atingiu o valor máximo de 1,85, o qual é 23 % e 36 % maior do que a encontrada nas plantas não inoculadas e daquelas cultivadas com APGc, respectivamente, observado aos 30 dpi. Aos 44 dpi, a razão $R:PA_{PF}$ foi de 1,54 para as plantas cultivadas com BPGc e 1,20 em média para as sob alto P, cuja diferença é de 33 %, quando a micorrização atingiu o pico de 63 %. No início, aos 14 dpi, o tratamento com BPni registrou o maior índice 1,90 para a razão $R:PA_{PF}$, sendo 40 % maior do que o de plantas sob BPGc. Entretanto, este índice caiu para 1,25, tornando-se 29 % menor do que o das plantas sob BPGc (1,62), sendo este último maior em relação aos demais aos 58 dpi, quando estas plantas apresentaram 58 % colonização das raízes. Ou seja, as plantas cultivadas com BPGc aumentaram a biomassa do sistema radicular que inicialmente era menor e passou a ser maior até os 58 dpi, superando os demais tratamentos.

Esta superioridade no crescimento das raízes das plantas sob BPGc também é evidente na razão $R:PA$ em termos de MS ($R:PA_{MS}$) em função do tempo. Aos 14 dpi, a razão $R:PA_{MS}$ das planta sob BPGc era 0,47, ou seja, 39 % menor em média do que os demais tratamentos, passando a razão a ser 1,04 e 1,23, portanto 22 % e 34 % maior em média a partir dos 44 e 58 dpi, respectivamente. O acúmulo de MS mostra a evolução das raízes mantidas com BPGc, as quais eram 72 % inferiores em média aos 14 dpi, passando a ser

9,6 % superior do que as outras raízes, aos 58 dpi (Tabela 4). Inversamente, a parte aérea desse tratamento, que não apresentava diferenças entre os tratamentos aos 14 dpi, passou a ter a menor biomassa seca, cerca de 22 % inferior que os demais. Estes dados corroboram com as observações quanto a relações entre raízes e parte aérea durante o desenvolvimento e acúmulo de biomassa (Tabelas 3 e 4), evidenciando o efeito da interação entre BP e a micorrização. Em função do tipo de empreendimento e do patamar tecnológico da produção comercial a cana como matéria prima deve ser considerada em toda sua parte aérea, excluindo-se a apenas as raízes e o rizoma. Neste experimento, considerando o seu curto prazo de 58 dias, a desproporção entre raiz e parte aérea observada não apresenta, aparentemente, um benefício para produção de matéria prima da cana-de-açúcar tratada com baixo Pi e inoculada com o FMA. É provável que, em condições de campo, a produção de massa seca da parte aérea de plantas micorrízicas apresente um comportamento diferente, podendo explorar ao máximo o volume do solo através do prolongamento das hifas do fungo micorrízico e quem sabe superaria os demais tratamentos na produção de matéria prima da cana, biomassa aérea.

A colonização e desenvolvimento de FMA exigem que haja trocas de nutrientes entre os simbioses. O fungo requer fotoassimilados e demanda de energia para o crescimento. Logo, o processo de micorrização foi similar a um dreno para a planta, a qual disponibilizou energia em detrimento do crescimento da parte aérea. As plantas apresentam diferentes níveis de resposta à simbiose, podendo ser influenciado pela disponibilidade de nutrientes e outros fatores como a combinação das espécies de fungo-planta, clima, solo, épocas do ano [85]. A cana-de-açúcar é pouco micotrófica e parece ter apresentado aqui uma relação simbiótica que não apresenta apenas características mutualísticas. Para os fungos biotróficos obrigatórios sempre há benefícios durante a simbiose. As respostas das plantas à colonização podem ser positivas, neutras ou negativas [103]. O custo de manutenção do fungo no sistema radicular das plantas pode ser expresso em termo de fotoassimilados,

tendo como bons indicadores nos sistemas agrícolas a produção de frutos semente e biomassa ^[103]. Apesar dos maiores contrastes na colonização aparecerem aos 30 e 44 dpi, aos 14 dpi tem-se 24 % de diferença entre plantas com baixo e alto Pi quando se observaram consideráveis contrastes entre teor de P_i nas raízes e principalmente na parte aérea independente da colonização. Período em que há intensa translocação de fósforo para parte aérea e que o estresse de Pi afeta a fisiologia da planta e não o crescimento, ponto interessante para se realizar o estudo sobre perfil de expressão de transcritos de cana-de-açúcar. Neste período houve uma maior disponibilidade de fosfato, conseqüentemente ativando-se regiões novas de absorção e pêlos radiculares que são de grande importância para a obtenção de nutrientes no solo. Com o desenvolvimento de regiões de deficiência de Pi ao redor da raiz, a aquisição efetiva de Pi além do alcance dos pêlos radiculares requer a aquisição micorrízica e/ou adaptações da planta, para solubilizar e extrair Pi adicional do sistema.

3.4.8 Partição de carbono

Nas plantas não inoculadas, a concentração de ATR na parte-aérea (ATR_{PA}) média cresceu entre os 30 e 44 dpi e depois caiu. Aos 30 dpi era de aproximadamente 0,9 nmoles mg⁻¹ passando para 1,5 nmoles mg⁻¹ aos 44 dpi, reduzindo-se a cerca de 29 % desse valor aos 58 dpi (0,4 nmoles mg⁻¹) independente da dose de Pi. De forma similar às médias gerais dos açúcares (Glu_{PA} = 0,3; Fru_{PA} = 0,2 e Sac_{PA} = 0,4 nmoles mg⁻¹) cresceram a partir dos 30 dpi e atingiram os maiores valores (Glu_{PA} = 0,6; Fru_{PA} = 0,4 e Sac_{PA} = 0,5 nmoles mg⁻¹) aos 44 dpi e depois decaíram (Glu_{PA} = 0,2; Fru_{PA} = 0,05 e Sac_{PA} = 0,2 nmoles mg⁻¹) aos 58 dpi, independente da dose de Pi nos tratamentos (Tabela 12). Essa diferença é significativa denotando o efeito do Tempo, independentemente da dose de Pi dos tratamentos (Tabela 12). Esses resultados sugerem quedas nas taxas fotossintéticas, caracterizando uma resposta de plasticidade – e uma maior eficiência do uso do Pi pelas plantas tratadas com BP – que a cana-de-açúcar demonstrou ao atingir a mesma biomassa total para todos os

tratamentos aos 58 dpi. É possível que as limitações impostas pelo sistema de cultivo adotado manifestem efeitos “secundários” – não desejados - associados a outros fatores (disponibilidade de nutrientes, tamanho vaso, tipo substrato, etc).

Os ATR_{PA} em plantas micorrízicas tiveram um comportamento diferencial com o tempo, embora não apresentaram diferenças significativas (Tabela 12). Nas plantas com MA e tratadas com BP a concentração de ATR_{PA} foi crescente entre os 30 dpi e 58 dpi ($0,8 \rightarrow 0,9 \rightarrow 1,3$ nmoles mg^{-1}), enquanto para aquelas cultivadas com AP, a concentração caiu aos 44 dpi ($TCI > 20$ %, taxa de colonização intra-radicular), e atingiu seu máximo aos 58 dpi ($0,7 \rightarrow 0,7 \rightarrow 1,4$ nmoles mg^{-1}).

Nas plantas com micorrizas sob efeito do BP, a concentração de Sac_{PA} teve um pequeno decréscimo entre o 14° e 30° dpi ($< 0,4$ nmoles mg^{-1}) coincidente com o incremento na TCI que passou de 25 % para 49 %, respectivamente. Aos 44 dpi a Sac_{PA} continuo crescente, atingindo o seu máximo aos 58 dpi ($\cong 0,6$ nmoles mg^{-1} , Tabela 12 e Figura 7) enquanto a TCI se manteve em torno de 60% no período (Figura 4).

Nas plantas micorrízicas e sob o AP a concentração de Sac_{PA} se manteve constante ($\cong 0,4$ nmoles mg^{-1}) entre o 14° e o 30° dpi, em seguida houve um decréscimo no 44° dpi ($Sac_{PA} \cong 0,25$ nmoles mg^{-1}), coincidente com incremento da TCI de 11,3 % para 20,6 % entre o 30° e 44° dpi. Por fim, a concentração de Sac_{PA} continuou crescente até o 58° dpi ($Sac_{PA} > 0,45$ nmoles mg^{-1} , Tabela 12 e Figura 7). Observou-se uma maior concentração da Sac nas plantas micorrízicas e cultivadas com BP aos 58 dpi ($0,6$ nmoles mg^{-1}), sendo significativo em relação à concentração da Sac_{PA} das plantas micorrízicas e tratadas com AP aos 44 dpi ($0,2$ nmoles mg^{-1}).

As plantas com micorrizas apresentam teores mais elevados de açúcares nas folhas em relação às não micorrízicas, essa amplitude tornou-se mais evidente aos 58 dpi, principalmente para a Sac (Figura 7). Em geral, encontra-se 3 vezes mais Sac nas folhas do

macrosimbionte do que nas plantas não colonizadas considerando o experimento como um todo e, pontualmente, mais evidente aos 14 e 58 dpi.

Quando a TCI variou entre 10 % a 25 %, observou-se um decréscimo da concentração de Sac_{PA} aos 30 dpi e 44 dpi para os tratamentos com BP e AP, respectivamente. Nos períodos seguintes, os incrementos da concentração de sacarose sugerem aumento das taxas fotossintéticas nas plantas micorrízicas. O intenso crescimento intra-radicular do fungo demandou por fotoassimilados, justamente quando a TCI dobrou aos 30 e 44 dpi para as doses BP e AP, respectivamente. Esse resultado sugere a modulação simbiótica do metabolismo fotossintético da planta para atender os custos energéticos excedentes da colonização, caracterizando o efeito da interação "Gc x Tempo". Essa interpretação dificilmente é observada a partir da relação entre o teor ou conteúdo de Pi e as TCIs.

Tabela 11. Avaliação do efeito da nutrição por fósforo (DP) e das micorrizas em cana-de-açúcar no teor foliar de açúcares redutores glicose (Glc), frutose (Fru) e sacarose (Sac), açúcares totais (ART) e na razão (S/M) sacarose:monossacarídeos (Glc e Fru). ANOVA apresenta os valores de quadrado médio (QM) para os fatores e interações: Tempo, dose de P (DP), inoculação com *G. clarum* (Gc), (DP x Gc), (Tempo x DP), (Tempo x DP x Gc) e repetições (Rep.).

Variável	GL	Glc	Fru	Sac	ART	S/M
(QM)						
Tempo	2	41327.4608	41533.5025**	8524.5211	0.2206	0.46018
Gc	1	20239.8044	446.6177	44387.4669	0.1098	0.80401
DP	1	18324.1344	38455.2100	150220.8402**	0.0031	0.01361
DP x Gc	1	17742.2400	2506.6711	1.1025	0.0340	0.09817
Tempo x DP	2	2517.1052	4641.1225	17070.9344	0.0450	0.41585
Tempo x Gc	2	442280.4586***	127825.9719***	137700.9077**	1.9261	2.51883
Tempo x DP x Gc	2	20582.3308	8075.6786	7494.6100	0.0967	0.65650
Rep.	2	3031.5608	4343.4475	10458.8869	0.0322	0.95923
CV (%)		52,24	51,95	31,92	41,26	108,69

Tabela 12. Médias das concentrações de glicose (Glc), frutose (Fru), sacarose (Sac), açúcares redutores totais (ART, Glc+Fru+Sac) e da razão sacarose:monossacarídeos (Sac/Fru+Glc). Resultados do teste de médias de Tukey para a interação Tempo x Gc, fixando-se o fator “Plantas micorrízicas” ou “não” (parte superior da tabela) e o fator Tempo, fixo aos 30, 44 ou 58 dpi (parte inferior).

Fator fixo : Plantas não micorrízicas											
Tempo	Dose de P	Glc		Fru		Sac		ART		S/M	
(dpi)	(mg kg ⁻¹)	(pmoles mg ⁻¹)		(pmoles mg ⁻¹)		(pmoles mg ⁻¹)		(pmoles mg ⁻¹)			
30	20	337,2	abc	170,1	Bc	410,6	ab	917,9	ab	1,0 A	
	200	326,0	abc	251,4	Abc	322,1	ab	899,5	ab	0,6 A	
44	20	570,4	ab	326,4	Ab	550,2	a	1447,0	a	0,6 A	
	200	678,0	a	429,3	A	407,6	ab	1514,9	a	0,4 A	
58	20	200,1	bc	73,2	C	298,6	ab	571,9	b	1,0 A	
	200	105,9	c	35,0	C	141,1	b	282,0	b	1,1 A	
Plantas com micorrizas											
30	20	293,5	a	150,6	A	393,7	ab	837,8	a	0,9 A	
	200	435,7	a	279,6	A	384,6	ab	1099,9	a	0,6 A	
44	20	291,0	a	145,9	A	489,7	ab	926,6	a	1,3 A	
	200	299,2	a	172,0	A	235,4	b	706,6	a	2,3 A	
58	20	532,3	a	202,0	A	585,6	a	1319,9	a	0,9 A	
	200	650,5	a	293,1	A	462,5	ab	1406,1	a	0,5 A	
Fator fixo:		Tempo (30, 44 ou 58 dpi)									
Tempo	Dose	FMA	Glc	Fru		Sac		ART		S/M	
(dpi)	(mg kg ⁻¹)	(Gc/ni)	(pmoles mg ⁻¹)	(pmoles mg ⁻¹)		(pmoles mg ⁻¹)		(pmoles mg ⁻¹)			
30	20	Gc	293,5	a	150,6	A	393,7	a	837,8	a	0,9 a
		ni	337,2	a	170,1	A	410,6	a	917,9	a	1,0 a
	200	Gc	435,7	a	279,6	A	384,6	a	1099,9	a	0,6 a
		ni	326,0	a	251,4	A	322,1	a	899,5	a	0,6 a
44	20	Gc	291,0	a	145,9	A	489,7	a	926,6	a	1,3 a
		ni	570,4	a	326,4	A	550,2	a	1447,0	a	0,6 a
	200	Gc	299,2	a	172,0	A	235,4	a	706,6	a	2,3 a
		ni	678,0	a	429,3	A	407,6	a	1514,9	a	0,4 a
58	20	Gc	532,3	ab	202,0	A	585,6	a	1319,9	a	0,9 a
		ni	200,1	bc	73,2	ab	298,6	ab	571,9	b	1,0 a
	200	Gc	650,5	a	293,1	ab	462,5	ab	1406,1	a	0,5 a
		ni	105,9	c	35,0	b	141,1	b	282,0	b	1,1 a

Médias (n=3) seguidas pela mesma letra indicam diferença não-significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 7. Concentração de sacarose ([Sac], linhas) e acúmulo de massa seca (MS, colunas) na parte aérea da plantas. As colunas brancas representam a menor dose de Pi (20 mg kg⁻¹) e as cinzas escuras a alta dose (200 mg kg⁻¹), enquanto as listras diagonais indicam a presença de micorrizas. As barras simbolizam o erro padrão da média (n = 4), em cada tempo (dias pós-inoculação, dpi).

As micorrizas arbusculares são importantes para a aquisição de Pi por causa do incremento no volume do solo explorado além da zona de depleção que circunda a rizosfera [109]. Em troca do fósforo fornecido à planta, o fungo obtém carbono reduzido [85]. O custo de carbono da aquisição micorrízica de Pi é um componente dos custos da aquisição desse nutriente na maioria das plantas [109]. Em feijão, assim como em outras espécies, a

colonização por micorrizas aumenta a aquisição de fósforo, o que resulta em um aumento da taxa de fotossíntese que não se traduz em crescimento para planta, por causa da maior taxa de respiração das raízes ^[110]. Em condições de alta disponibilidade de Pi, a colonização micorrízica reduziu o crescimento de plântulas de *citrus* por causa do elevado custo de carbono ^[105]. Em geral, o custo de carbono da simbiose de micorrizas varia de 4 a 20 % da fotossíntese diária para diferentes espécies herbáceas ou lenhosas de plantas ^[104, 109, 110], podendo contribuir para uma interação não benéfica ou até mesmo parasítica do fungo. Os resultados apresentados sugerem que a cana-de-açúcar respondeu de forma variável as doses de Pi. Apresentando boa plasticidade fisiológica ao alterar seu rito de crescimento e alometria sem comprometer o total da biomassa acumulada após 58 dpi, demonstrando ser uma gramínea robusta.

Outro mecanismo comum no aumento da aquisição de fósforo é o crescimento da raiz em detrimento da parte aérea. Plantas sob deficiência de Pi tipicamente possuem elevada razão raiz:parte-aérea (R:PA), seja por alterações das relações alométricas ou pelo incremento da biomassa alocada na raiz ^[109, 111]. Reich (2002) ^[112] enfatiza a dificuldade em monitorar a alocação de carbono provenientes da alteração da proporção raiz:parte-aérea abaixo do solo, uma vez que tratamentos com baixo Pi resultam em plantas de tamanhos diferentes, altera-se a razão raiz:parte-aérea via alometria. Entretanto Lynch e Ho (2005) ^[109], contra-argumentam que o monitoramento pontual da razão raiz:parte aérea integrado ao tempo pode dar uma estimativa real da porção diária de fotossintato consumida pela raiz. Em feijão, demonstrou-se haver uma correlação positiva entre a alocação de carbono para a raiz com análises alométricas e distribuição de biomassa e, que para o propósito de discussão do custo de aquisição de fósforo e manutenção do sistema radicular essa abordagem é válida ^[109].

Em leguminosas foi evidenciado que a redução no crescimento, em função da baixa disponibilidade de Pi, está associada ao incremento na proporção de biomassa da raiz, a

redução do surgimento e taxa de expansão foliar, e não relacionada a redução da assimilação de carbono pelas folhas ^[111]. Esses padrões observados são consistentes com o teorema que a alocação de carbono é um balanço entre as fontes de energia luminosa e nutrientes. As plantas sob efeito da depleção por Pi utilizam boa parte do carbono diário assimilado para respiração das raízes (40 %) comparando com o utilizado por plantas fósforo suficientes (20 %) ^[111]. O aumento dos custos de carbono para a manutenção das raízes sob deficiência de fósforo, devido a alterações da proporção raiz:parte-aérea, pode representar uma queda da produtividade vegetal. Até os 58 dpi o crescimento de plantas micorrízicas teve uma redução do crescimento da parte aérea, em cultivo e vasos. Em condições de campo, as micorrizas poderiam proporcionar uma vantagem na aquisição de Pi além da rizosfera. Em longo prazo essa poderia ser uma compensação para os custos de manutenção das micorrizas. Por outro lado, a concentração de açúcares solúveis, especialmente a sacarose se manteve elevada em plantas micorrízicas, seria interessante avaliar esse efeito em longo prazo e na produtividade.

3.5 CONCLUSÕES

O BP induziu a deficiência de Pi nas plantas, micorrízicas ou não. A eficiência de absorção, indicada pelo acúmulo de Pi na parte-aérea a dada biomassa da raiz, foi igual para todos os tratamentos, sugerindo que as eficiências radicular e micorrízica da absorção de Pi foram similares, independentemente da doses de Pi. A disponibilidade de fósforo não afetou a biomassa total das plantas, sendo as cultivadas sob o BP mais eficientes na utilização deste nutriente. Por outro lado, as plantas micorrízicas suplementadas com BP apresentaram maior crescimento da raiz e redução na parte-aérea, resultando no aumento da proporção raiz:parte-aérea.

Aos 58 dpi, a glicose, frutose e sacarose presente nas folhas de plantas micorrízicas foi 3,8, 2,3 e 2,4 vezes mais concentrada do que nas não micorrízicas, respectivamente. Esses resultados sugerem que, nestas condições experimentais, o estabelecimento da simbiose não foi uma associação mutualística típica, afetando o perfil de crescimento e a alometria da cana cultivada com BP. As concentrações de fotoassimilados na folhas de planta micorrízicas indicam que houve aumentos nas taxas fotossintéticas, mas isso não resultou no maior crescimento do macrosimbionte.

4. ESTUDO DE GENES DE REFERÊNCIA E VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORS DE FOSFATO EM RAÍZES MICORRÍZICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

A técnica de PCR em Tempo Real se tornou uma opção para a validação funcional de genes com alta sensibilidade, acurada quantificação e eficácia. A quantificação relativa da expressão de genes é relativamente fácil e determina a expressão de um gene em relação a outro expresso e constante. Neste trabalho foi avaliada a variabilidade de expressão de dos genes *Actina*, *GAPDH*, *Tubulina*, *UbiQ1* e *UbiQ2* e comparou-se a classificação dessa variabilidade obtida pelos programas Genorm e NormFinder. Em seguida, foram realizadas análises de expressão gênica utilizando o programa REST para a validação da expressão de genes de cana-de-açúcar. A *UbiQ1* é o gene mais estável dentre os candidatos e tecidos e órgãos testados: meristema, inflorescência, folha, colmo e raízes tratadas com alto e baixo fósforo. É um competente gene de referência para meristema, inflorescência quando comparados à folha. A *UbiQ2* foi o melhor candidato para o colmo, e alternativamente o fator de normalização que inclui *Tubulina* e *UbiQ1* também funciona. Enquanto a *Actina* pode ser indicada para comparação ente raiz e folha. Os genes de referência apresentados aqui são sugestões para a acurada normalização via qPCR em tempo real para os tecidos testados, no entanto o delineamento experimental e os genes de interesse devem ser considerados para se atingir a possibilidade de uma validação biológica de relevância de pequenas diferenças de expressão gênica em cana-de-açúcar. Considerando o gene *UbiQ1* como referência, a expressão relativa dos genes transportadores de fosfato de cana *PT7* e *PT8* foi avaliada em amostras de raiz fertilizadas com AP ou BP e coletadas aos 58 dpi com fungo micorrízico. Os genes *PT7* e *PT8* pertencem à família Pht1 de transportadores de fosfato e são similares aos ortólogos *ORYsa;tPht1;7* e *ORYsa;Pht1;8* de arroz. Sob deficiência de Pi, a expressão do transportador de fosfato *PT7* foi induzido em raízes não micorrízicas, já nas micorrízicas foi pouco expresso. Altas taxas de colonização radicular suprimiram a expressão do *PT7*. O *PT8* pouco variou sua expressão, sendo sutilmente mais expresso em plantas micorrízicas do que nas não micorrízicas sob o suprimento de BP. Estes resultados indicam que o *PT7* é induzido em raízes sob estresse por Pi e provavelmente associado à absorção radicular de Pi. Enquanto o gene *PT8* possui uma modulação pouco variável provavelmente envolvido na manutenção do fluxo ou homeostase de Pi, possivelmente associado com a absorção radicular e micorrízica de fosfato. O *PT7* e *PT8* foram expressos em tratamentos de médio/longo prazo, apresentando expressão ou indução em resposta à privação por Pi, o que é consistente com prévios estudos que propõem uma função de aquisição e

mobilização de Pi para esta família de transportadores. A cana-de-açúcar micorrízica mostrou alta plasticidade de resposta ao BP. Em síntese, se respostas positivas ou negativas do crescimento da planta ocorrem durante a simbiose dependerá de fatores limitantes do ambiente, do genótipo/combinção de planta e fungo, e portanto das estratégias moleculares e fisiológicas simbióticas que contribuem para “eficiência”.

ABSTRACT

Real time RT-PCR has become a method of choice for functional gene validation with sensitiveness, accurate quantification and high-throughput. Relative quantification is somewhat easy by determining the relative gene expressed-fold in relation to another, constant well expressed. Classical housekeeping genes have been used for normalization even though they were demonstrated to be regulated, a decade before real time quantification methods were available. Real time place emphasis in quantities changes so classical reference genes should be re-evaluated. Herein we assessed the expression variation of *Actin*, *GAPDH*, *Tubulin*, *UbiQ1* and *UbiQ2* and compared the ranking list of the Genorm, NormFinder tools. Then we performed expression analysis using REST tool for the proper validation of reference genes. *UbiQ1* is the most stable gene along the tissue or organs tested: meristem, inflorescence, leaf, stem and roots treated with high and low phosphorus. It is suitable reference gene for meristem, inflorescence when compared to leaf. *UbiQ2* was the best candidate for stem, and alternatively the normalization factor including *Tubulin* and *UbiQ1* works too; whereas *Actin* was indicated as a normalizer for root treatments. The reference genes presented here are suggestions for accurate real time qPCR normalization for tissues tested, moreover experimental design and target genes must be considered to achieve the possibility of validating the biological relevance of small expression differences in sugarcane. Considering *UbiQ1* as a reference gene, the relative expression of the sugarcane phosphate transporters genes *PT7* and *PT8* were assessed from roots fertilized with low and high Pi, and harvest 58 dpi with the mycorrhizal fungus. Both genes belong to the Pht1 Pi transporter and share similarity to the rice orthologs *ORYsat;Pht1;7* and *ORYsat;Pht1;8*. Under Pi deficiency, the expression of the phosphate transporter *PT7* was induced in NM roots, but less expressed in AM ones. High root colonization rates suppressed *PT7* expression. *PT8* showed low variability expression, slightly more expressed in mycorrhizal plants than in NM plants under low Pi supply. These results indicate that *PT7* was induced in Pi stressed roots and possibly associated with the root Pi uptake, while *PT8* had low variability modulation and probably involved on Pi fluxes or homeostasis, most likely associated with both root and mycorrhizal phosphate uptake pathways. *PT7* and *PT8* were induced during medium/long-term treatments, showing expression or induction in response to Pi deprivation, which is consistent with previous studies that proposed a role in acquisition and mobilization of Pi for this family of transporters. AM sugarcane showed a highly

plastic response to low P_i . In summary, whether a negative or positive plant growth response occurs during the symbiosis will depend on the environment limiting factors, on the plant and fungus genotype/combination, hence on the molecular and physiological strategies of the association that contribute to "efficiency".

4.1 Introdução

A simbiose micorrízica arbuscular é sem dúvida a simbiose mais comum do solo, com cerca de 80 % das espécies de plantas terrestres potencialmente capazes de associar-se a membros do filo Glomeromycota, no qual foram incluídos os FMA ^[85, 135]. Embora nem sempre simbiótica, a natureza mutualística da associação entre FMA e plantas, caracteriza-se por beneficiar a planta com nutrientes minerais derivados do solo fornecidos pelo fungo, principalmente o Pi, cuja fonte predominante no solo (ortofosfato) possui baixa disponibilidade e mobilidade. Enquanto o fungo recebe carbono orgânico da planta ^[84]. É mais provável que a absorção de fosfato tenha sido a vantagem seletiva original, e que a simbiose evoluiu contemporaneamente com a flora terrestre, em uma época em que a absorção de íons fosfato pelas plantas era um desafio à sobrevivência ^[135]. As plantas desenvolveram várias estratégias para incrementar a absorção de fósforo, incluindo a formação de micorrizas arbusculares e a modulação de genes transportadores de fosfato envolvidos na absorção micorrízica ou radicular de fosfato ^[69].

Muitos solos são deficientes em fósforo, principalmente os tropicais, demandando amplo uso de fertilizantes para se obter a produtividade agrícola esperada. Contudo, a ineficiência, o custo e o impacto ambiental associado ao uso de fertilizantes têm levado a busca de tecnologias que incrementem a absorção e uso do P pelas plantas. A identificação e manipulação de genes envolvidos na absorção e uso do fósforo, presente em baixas concentrações na solução do solo ($< 10 \mu\text{M}$) ^[38], é uma das possíveis estratégias para gerar novas tecnologias de otimização do agrícola do fósforo. Outra estratégia para melhor utilizar o fósforo e a aplicação de micorrizas arbusculares na agricultura.

Estudos atuais de genes transportadores de fosfato em plantas têm sido desenvolvidos em paralelo a estudos da cinética de absorção micorrízica de Pi em plantas com cereais, solanáceas e leguminosas. Técnicas de imuno localização têm contribuído para

avanços na compreensão da modulação e tecido especificidade de transportadores de fosfato. Estudos de expressão gênica revelaram haver transportadores de fosfato específicos, induzidos durante a simbiose, e outros que pouco alteram sua modulação ou ainda, aqueles específicos na absorção de Pi não micorrízica. Em arroz foram identificados onze transportadores de fosfato do tipo *Pht1*, sendo o transportador *Pht1;11* sendo fortemente induzido na presença de micorrizas ^[79]. A caracterização filogenética e estudos de promotores destes genes transportadores têm contribuído para identificação da função sob o aspecto evolutivo em diferentes tipos de plantas Mono e dicotiledôneas, e ainda sobre o comportamento funcional e co-evolutivo dos transportadores de fosfato expressos durante a simbiose.

As evidências supra citadas levam a crer a cana-de-açúcar possua transportadores de fosfato tipo *Pht1* com diferentes funções na absorção e translocação de fósforo na planta e, apesar de pouco micotrófica, possivelmente exista pelo menos um membro desta subfamília multigênica envolvido na absorção micorrízica de fosfato. Além disto, por serem as gramíneas mais eficazes na absorção de Pi quando comparada às leguminosas, poderia-se questionar qual seria a contribuição ou quais transportadores de fosfato estariam envolvidos nesse processo eficaz da absorção de fosfata em cana-de-açúcar.

Hoje, os estudos da expressão e a validação funcional de genes têm sido realizados pela detecção da amplificação de ácidos nucléicos através da emissão de fluorescência em tempo real – técnica conhecida como PCR em Tempo Real ou PCR quantitativo (qPCR) – amplamente aceita por sua sensibilidade, acurácia e praticidade de obter resultados ^[131, 137, 138]. Ela permite, em uma de suas abordagens, quantificar os transcritos de um gene em relação a outro dito gene de referência.

A fim de estudar genes da cana-de-açúcar, em particular os transportadores de fosfato, utilizando a quantificação relativa da expressão gênica, parte deste trabalho foi dedicada ao estabelecimento da rotina de quantificação relativa via qPCR, estudo de algoritmos que avaliam a estabilidade de expressão de genes e validam estatisticamente a

expressão relativa, programas como o GeNorm^[139], NormFinder^[140] e REST ^[141, 142]. Com este propósito foram avaliados cinco candidatos de cana-de-açúcar a gene de referência, comumente conhecidos por possuírem funções básicas (*housekeeping genes*) e estabilidade de expressão, listados a seguir (genes/proteína): *Actina* (β -actina), *Tubulina* (Tubulina β -2/ β -3), *GAPDH* (gliceroaldeido-3-fosfato desidrogenase/citossólica) e as poliubiquitinas (*UbiQ*) 1 e 2. Esses genes foram detectados em tecidos ou órgãos das bibliotecas de EST do projeto genoma da cana-de-açúcar, o SUCEST ^[143].

Para a quantificação da expressão gênica via qPCR, estes *housekeeping genes* foram avaliados quanto à estabilidade de expressão no meristema, inflorescência, colmo e raízes de cana cultivadas com baixo ou alto Pi. Em seguida foram realizados estudos de expressão de dois genes transportadores de fosfato (*PT7* e *PT8*) de cana-de-açúcar, em raízes cultivadas com alto ou baixo fósforo aos 58 dias pós-inoculação (dpi) com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* (Gc). Para melhor caracterizar estes transportadores de fosfato, estimou-se o número de cópias de cada gene, encontrados em regiões distintas do genoma da cana-de-açúcar. Em uma região promotora do *PT8* foram identificadas seqüências regulatórias associadas à regulação por estresse por fósforo. A avaliação da expressão dos genes sugere que o *PT8* está envolvido na manutenção da absorção e/ou translocação de fosfato na raiz enquanto o *PT7* estaria envolvido na absorção não micorrízica do fosfato sob efeito da baixa disponibilidade do nutriente.

Revisão de Literatura

4.2.1 PCR na era genômica

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica para síntese *in vitro* de material genético, para amplificar o DNA, possibilitando fazer até bilhões de cópias de uma molécula de DNA em poucas horas. A PCR revolucionou a tecnologia de manipulação do DNA e por que não dizer a biologia molecular, permitindo se produzir profícuo DNA com certo grau de pureza, para manuseá-lo visando responder perguntas como: qual sua relação com uma determinada doença, ou qualquer outra questão biológica relacionada ao DNA. A tecnologia da PCR espalhou-se com as mais diversificadas aplicações e derivações. A associação da reação de transcrição reversa (RT) – síntese do DNA complementar a um RNA mensageiro (mRNA) - com a PCR possibilitou a detecção qualitativa e semiquantitativa de transcritos ^[130, 131].

A mais recente evolução da PCR, a amplificação de mRNA via Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) conjugada com a emissão de fluorescência em tempo real, ou seja, a PCR em Tempo Real ou PCR Quantitativa (qPCR), é uma das tecnologias disponíveis que se popularizou para quantificação de ácidos nucleicos ^[132]. Em estudos de genômica e do perfil transcricional, a validação funcional e análise de expressão de genes via *northern blot* ou PCR Quantitativo é uma das etapas cruciais na caracterização desse supostos genes de interesse.

A reprodutibilidade da quantificação da síntese e amplificação de ácidos nucleicos tem sido o objetivo na pesquisa nas mais diversas áreas da ciência. O processo utilizado tradicionalmente requer análises de “*end-point*”, ou seja, de detecção de produto final da amplificação através de géis de eletroforese ^[133]. Esse método permite a detecção do tamanho em pares de bases (pb) do produto alvo e do(s) competidor(es) da PCR, uma estimativa da pureza e possibilita a densitometria da intensidade das bandas detectadas.

Contudo, a reprodutibilidade dos resultados desse tipo de análise é variável devido a fatores limitantes no final da reação, como o consumo e o desbalanço de substratos (nucleotídeos e iniciadores), cofatores (Mg^{2+}), inibição e ou interferência de produtos (amplicon, dímeros, competidores, pirofosfato), que alteram a eficiência do processo de amplificação ^[133, 134].

A PCR é composta por três fases características a fase exponencial inicial, a fase linear e a fase final que tende a uma constata, o platô. Na fase exponencial da amplificação, existe uma relação direta entre a quantidade de DNA molde inicial e o produto da reação, à qual pode-se ajustar um modelo matemático apropriado para quantificar a amplificação, com a reprodutibilidade e confiabilidade do rigor científico ^[133]. Esse é o princípio fundamental da quantificação de DNA em tempo real. A aplicação de certos corantes específicos que se intercalam ao DNA e químicas fluorescentes na PCR, utilizadas para marcação de sondas de DNA, e os avanços na biologia molecular possibilitaram quantificar, detectar e estudar genes em tempo real ^[134].

Os instrumentos de qPCR consistem em termocicladores associados a fluorômetros, alguns com múltiplos filtros de detecção, que realizam leituras durante as etapas do ciclo da reação. Os dados de fluorescência são coletados através de computadores acoplados ao sistema de detecção e, simultaneamente, apresentados graficamente, revelando a cinética da PCR em tempo real. Uma amostragem sobre esses instrumentos está disponível no sítio <http://www.gene-quantification.info/>.

4.2.2 Químicas populares: SYBR® Green, TaqMan® e Molecular Beacons

A tecnologia SYBR GREEN® (Molecular Probes) utiliza essa pequena molécula que se liga a cavidade menor da dupla hélice do DNA que quando excitado pela luz (290, 380 e 497 nm) emite fluorescência (520 nm)^[136]. Assim, com o acúmulo do produto do PCR a fluorescência aumenta. Por conseguinte, a mensuração do pico de fluorescência em cada ciclo da PCR é realizada na etapa de anelamento e/ou extensão, e corresponde a quantidade de DNA presente no microtubo naquele momento. O corante é capaz de se ligar a qualquer

DNA dupla hélice durante a PCR, incluindo-se dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos da reação, o que pode resultar na superestimação da concentração do produto de interesse. A obtenção de uma curva de dissociação do DNA após o final da PCR é um controle que pode indicar a especificidade pelo produto ^[134].

A principal vantagem do SYBR Green® (Molecular Probes) é o seu baixo custo, praticidade e sensibilidade, não requerendo a utilização de sondas ou iniciadores com conformação modificada. O produto da reação, também chamado de amplicon, deve ser único diante de iniciadores bem desenhados ^[131, 134]. Nessa condição é bastante eficaz, o sinal de fluorescência de fundo ou ruído (*background*) é mínimo e inerente da reação.

As duas alternativas mais populares ao SYBR Green® (Molecular Probes) são os sistemas TaqMan® (uma alusão ao video-jogo PacMan) e o *molecular beacons*, ambos baseiam-se na detecção da fluorescência advinda da transferência de energia por ressonância, da sigla em inglês FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)^[134].

O Sistema TaqMan® utiliza sondas, que são oligonucleotídeos que contêm um corante fluorescente (ou fluoróforo) acoplado, comumente, na base da extremidade 5' e um quêncher localizado na base da extremidade 3' do oligonucleotídeo. Quando irradiado, o fluoróforo transfere sua energia de excitação ao quêncher que está muito próximo, resultando em um substrato não fluorescente. A sonda TaqMan® é desenhada para anelar no DNA molde/amplicon, na região interjacente entre os iniciadores da PCR ^[134, 136]. Durante a reação, quando a enzima polimerase duplica o DNA molde, ao qual a sonda TaqMan® está anelada, a atividade exonuclease 5' da enzima cliva a sonda. Essa clivagem separa o fluoróforo do quêncher, interrompendo o fenômeno FRET e favorecendo a produção de fluorescência, em quantidades crescentes proporcionais as taxas de clivagem da sonda ^[134, 136].

Molecular Beacons, outro sistema comumente utilizado em qPCR, também possui fluoróforo e o quêncher. A sonda desse sistema é desenhada para permanecer em estrutura de dupla hélice, autocomplementar, ou seja, em forma de grampo, enquanto estiver livre

em solução. Nessa condição, fluoróforo e qüencher situados nas extremidades opostas da sonda, estão muito próximos realizando o fenômeno da FRET ^[134]. Quando a sonda *Molecular Beacons* anela na seqüência alvo durante a PCR, fluoróforo e qüencher afastam-se, de modo que a FRET não ocorre, e o fluoróforo emite luz apenas quando irradiado ^[134]. A sonda *Molecular Beacons* difere daquela do sistema TaqMan, pois se mantém intactas durante a reação de amplificação e religando-se a seqüência alvo a cada novo ciclo para detecção da fluorescência.

Os sistemas tipo *TaqMan* e *Molecular Beacons* permitem a realização de múltiplas reações (PCR multiplex) de amplificação de diversos DNAs em um único tubo. O PCR multiplex é possível, desde que se introduza um fluoróforo que emita diferente comprimento de onda para cada sonda gene-específico que se deseja detectar, podendo incluir-se aí controles internos no mesmo tubo de reação ^[134]. Assim é possível co-amplificar controles internos, obter discriminações alélicas em uma única reação, em condições homogêneas, uma vantagem em relação à tecnologia SYBR Green® (Molecular Probes), porém a maiores custos.

Um exemplo da precisão e acurácia do qPCR comparando as tecnologias SYBR Green® (Molecular Probes) e TaqMan®, utilizando iniciadores universais para seqüência da subunidade 18S do rRNA, revelou mínimas diferenças entre estes sistemas. Para este teste foi utilizada uma diluição serial da ordem de 10⁷ vezes na reação de síntese de cDNA, seguida da PCR com iniciadores 18S via SYBR Green® e TaqMan® ^[136]. A detecção do gene e a curva praticamente não diferiram entre os métodos. O sistema SYBR Green® ocasionalmente registrou falso sinal ao final da PCR, correspondendo à ordem de femtogramas gramas de RNA, com mínimas conseqüências na acurácia de detecção do RNAs de baixa freqüência ^[136].

4.2.3 Estratégias para quantificação de expressão

Existem duas estratégias para quantificação de DNA via PCR em Tempo Real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa ^[131, 134]. Na quantificação absoluta

determina-se com precisão o número de cópias de um determinado DNA pela comparação com uma curva de calibração apropriada. Para poder contrastar os resultados e quantificar cada amostra de DNA são necessários padrões cuidadosamente elaborados e precisos, cuja obtenção é difícil e laborioso pois, demanda precisão na quantificação de concentrações dos padrões ^[131,132]. Uma vez que a calibração esteja bem definida, a quantificação absoluta facilita a comparação entre os resultados de expressão gênica obtidos entre diferentes dias e ou laboratórios ^[132].

Por outro lado, a quantificação relativa via qPCR é de certa maneira fácil, uma vez que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos da amostra, e sim expressa em termos da quantidade relativa de transcritos em relação a outro gene expresso e constante, denominado **gene de referência** ^[134, 138]. A quantificação consiste em obter a razão de expressão entre **um gene alvo** (de interesse), em relação a outro denominado gene de referência. Esse método é, na maioria das vezes, adequada para a investigação de mudanças fisiológicas em termos de expressão gênica ^[132]. As tendências e processos biológicos podem ser mais bem explicados pela quantificação relativa, porém os resultado obtido dependem do(s) gene(s) de referência escolhido(s) e dos procedimentos de normalização utilizados ^[132].

4.2.4 qPCR: virtudes e imperfeições

Os principais benefícios advindos da qPCR incluem alta sensibilidade, acurada quantificação de genes e ágil obtenção dados em larga escala (*high-throughput*), neste mundo globalizado esses atributos favoreceram sua ampla adoção, entretanto certas limitações e imperfeições - atreladas a suas principais virtudes - tem sido questionadas. Vários fatores têm contribuído para ampla adoção da qPCR como ferramenta de pesquisa e biologia molecular: (i) trata-se de um sistema simplificado de análise que não necessita processamento pós-PCR, (ii) possui vasta dinâmica de detecção, na ordem $>10^7$ - o que permite a direta comparação entre DNAs que diferem amplamente em sua abundância - (iii)

os resultados da análise obtida possibilitaram explorar o potencial quantitativo da PCR, tornando-a por fim, uma metodologia quantitativa e qualitativa ^[144]. O que resultou na aplicação dessa tecnologia em estudos de genômica funcional, medicina molecular, estudos forenses, virologia, microbiologia, evolução e biotecnologia. É presumível que essa ampla aceitação e globalização no meio científico seja resultado de uma tecnologia plenamente estabelecida e padronizada ^[132]. Na realidade isso não é verdade. As limitações da PCR em Tempo Real são similares as da abordagem feita durante a RT-PCR convencional. Um pouco além, alguns desses problemas são acerbados pelas aspirações quantitativas da qPCR, e não apenas pela íntima associação entre a quantificação e a eficiência de amplificação ^[145]. É preocupante a fiabilidade dos dados quantitativos da qPCR e suas implicações na validação biológica, e como essa questão ainda não é devidamente apreciada ou conhecida ^[132]. Um exemplo claro é o valor do “ciclo de detecção” (*threshold-cycle*, Ct), o qual demarca o ciclo da reação em que a fluorescência emitida excede um limite (*threshold*) escolhido acima do ruído ^[132]. O “Ct” tem sido usado para a quantificação do número de cópias de um gene de interesse, embora seu valor seja inteiramente subjetivo, uma vez que o limite de detecção, o *threshold*, é arbitrário e pode ser mudado. Em perspectiva, dois outros atributos que merecem apreço são: a RT e os procedimentos para a normalização de dados ^[132].

Dentre os problemas citados, a normalização da PCR em tempo real é um dos aspectos de maior dificuldade e importância. Várias estratégias têm sido sugeridas para o sucesso da normalização de dados em PCR em tempo real ^[132]. Estas compreendem cuidados como utilização de mesma quantidade de amostra, a escolha do gene de referência e o modelo matemático de análise dos dados. Estes atributos não são mutuamente exclusivos, podendo ser incorporados na rotina da qPCR, os quais serão comentados a seguir.

4.2.4.1 Cuidados para normalização em qPCR

- a) **Amostragem** - A obtenção de amostras de mesmo “tamanho” (volume e massa) proveniente de tecidos similares é a primeira medida direta para redução do erro

experimental, porém não garante representatividade. Um bom exemplo é sangue, que pode ser facilmente coletado e seu volume aferido para várias amostras. Entretanto, pode levar a um erro quando se tratando de pacientes soro positivo para o vírus HIV^[137]. Pacientes com HIV em estágio inicial de imunossupressão produziram maiores quantidades de RNA extraído para o mesmo volume de sangue do que aqueles com imunossupressão avançada, pois possuem menor número de células por mililitro de sangue ^[137].

- b) **Quantificação do RNA** - Em contraste ao DNA, o RNA é instável quando extraído da célula, exigindo cuidados e habilidade para manipulação, sendo assim a sua inclusão em experimentos de PCR em tempo real demanda os seguintes critérios: (i) alta qualidade se os resultados quantitativos são mais relevantes, (ii) livre de contaminação por DNA, especialmente tratando-se de gene sem íntron, (iii) Não co-purificar inibidores da RT ou da PCR, (iv) livre de nucleases para poder ser estocado por longos períodos ^[131]. Em geral, a qualidade do RNA é verificada via fracionamento eletroforético, observando-se as bandas 28S e 18S da fração ribossomal do RNA. Esse diagnóstico é laborioso e pouco produtivo para aplicação em larga escala e requer certa quantidade de amostra. Existem outros aparatos como: Agilent's (Palo Alto, CA), RNA LabChip, 2100 Bionalyzer para o uso em larga escala e convenientes para acessar a qualidade do RNA ^[137].
- c) **Pureza da amostra** - O segundo ponto é a co-purificação de inibidores durante a preparação amostras de RNA para qPCR. Como por exemplo: o sangue de mamíferos contém inibidores da Taq-DNA polimerase, especialmente a hemoglobina; o ácido húmico do solo também é; juntamente com cálcio outro potente inibidor que possivelmente está presente em amostras de comida ^[144]. Certas drogas utilizadas para tratamentos ou pesquisas, como exemplo o *acyclovir* utilizada no tratamento de retrovírus, inibem a Taq-DNA polimerase dando resultados de falso negativo no diagnóstico de pacientes ^[144]. Até mesmo meios de cultura ou reagentes de extração de ácidos nucleicos podem reduzir a eficiência da PCR. Em termos práticos, é difícil associar variações legítimas no

mRNA devido a inibidores presente em amostras distintas que possam ter afetado a etapa da RT ou PCR. Por outro lado, certos compostos, como o agente redutor ditioneitol (DTT) comumente usado para quebrar ligações da estrutura secundária do RNA e assim facilitar o início e processamento de transcrição reversa, podem retardar ou inibir a detecção de fluorescência em reações de RT qPCR de etapa única (*one-step RT qPCR*) ^[145]. Um controle que pode ser feito é teste uma amostra que não possua sequência parecida com os RNAs alvos. Por exemplo, para investigação de expressão em genes humanos, um amplicon de planta ou artificial pode ser testado para verificar a presença de inibidores ^[144]. Basta verificar a amplificação do produto artificial, na presença ou não do RNA da amostra humana. Na presença de um inibidor, a detecção da amostra artificial vai ser tardia, após vários ciclos, ao passo que na amostra controle com água o amplicon artificial será com menor número de ciclos da PCR ^[144].

- d) **Normalização contra o RNA total** - A Normalização em relação ao RNA total, não considera as variações inerentes das frações do RNA, nem tampouco controla as variações provenientes da RT ou PCR. A normalização contra o RNA total estima principalmente o RNA ribossomal, o qual representa até 80 % do total. Em geral, o interesse é mensurar o RNA mensageiro que codifica as proteínas e compreende uma fração entre 2 a 5 % do RNA total. Assumir que a proporção de rRNA:mRNA é invariável entre tipos celulares, tecidos ou condições ambientais é um equívoco ^[137, 144].
- e) **Normalização contra o DNA genômico** - O DNA genômico também foi sugerido como uma opção para a normalização da PCR em tempo real, sendo um método interessante uma vez que não é preciso a síntese de DNA complementar, a transcrição reversa. Células que estão em proliferação, estão replicando seu material genético, portanto têm mais informação genética que outras que não estão em multiplicação. Em organismos eucarióticos, essa diferença é usualmente menor que dois (≤ 2), o que não é tão problemática. Em contra partida, em células de tumores frequentemente ocorre variação de ploidia, enquanto em células de bactérias ativamente replicantes podem conter até

oito vezes mais cópias de certos *loci* do que células não replicantes^[137]. Outra limitação é que os protocolos de extração de RNA usuais não são aptos para purificar DNA simultaneamente ^[144].

- f) **Genes de referência** - Historicamente, os *housekeeping genes* como: o gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tubulina, actina, ubiquitina, albumina, ciclofilina, assim como os genes não protéicos como as subunidades 18S e 25S dos rRNAs têm sido propostos como genes controle para *Northern Blot*, Ensaio de Proteção contra Ribonucleases [*RNAse Protection Assays* (RPA)], e ensaios qualitativos de RT-PCR^[137]. É aceitável a utilização desses genes para estas abordagens semi ou não quantitativa, nas quais variações qualitativas são detectadas. Entretanto, não são indicados para mensurações quantitativas via PCR em Tempo Real sem serem previamente testados para as condições experimentais específicas e questionados quanto ao objetivo (hipótese) da aplicação ^[137].

A normalização através de genes de referência é um método simples para o controle interno do erro experimental da qPCR. Nesse caso o gene de interesse e o de referência estão sujeitos às variações provenientes do todo o processo, desde o método de extração de RNA até a quantificação de transcritos, podendo controlar variações nas quantidades iniciais do ácido ribonucléico ^[140, 144]. Genes constitutivos, ou simplesmente *housekeeping genes* (HKG), são responsáveis por funções básicas para a manutenção do funcionamento celular, cuja expressão já foi tida como constante através dos estádios de desenvolvimento, tipos celulares/tecidos e condições fisiológicas ^[137, 144]. Não obstante, já é sabido que virtualmente todo gene possui algum grau de modulação na sua transcrição, portanto é imperativo que o gene (ou genes) escolhido para ser o referencial da quantificação mantenha uma expressão constante nas condições experimentais. Contudo, o advento da PCR em tempo real enfatiza pequenas variações moleculares de modo que estes genes de referência comumente usados, os HKG, precisam ser reavaliados ^[137, 146]. No entanto, várias publicações utilizam estes genes constitutivos

sem validação apropriada como genes controle da sua presumível estabilidade de expressão. Bas *et al* (2004)^[147] e Tricocarico *et al* (2002)^[148] demonstraram que a escolha equivocada do gene de referência pode resultar na alteração da validação biológica de genes de interesse. Logo, certos critérios devem ser estabelecidos para escolha do(s) gene(s) de referência.

Um argumento contra a utilização do rRNA como padrão/referência é a sua variabilidade e desproporção quanto a sua quantidade, em termos de massa, em relação ao RNA mensageiro (mRNA)^[132, 137]. Esse aspecto deve ser considerado ao se prepara diluições seriadas para curvas de calibração ou durante a quantificação relativa utilizando o rRNA como gene de referência. Bo-Ka Kim *et al.* (2003)^[149], ao comparar a variação de expressão entre seis cultivares de arroz durante estádios de crescimento de plântulas, observou serem estáveis os genes 18S do rRNA e a *Tubulina*, enquanto os genes *GAPDH* e *Actina* tiveram uma variação de 2 vezes, para apenas um cultivar, o Dasan^[149]. O perfil de expressão destes genes constitutivos vêm sendo bem estudado e documentado em humanos, porém ainda existe certa lacuna de informação a respeito destes em plantas.

Além disso, os genes ribossomais possuem um *aparatus* de transcrição diferente daquele de genes traduzidos e codificadores de proteínas. As RNAs polimerases eucarióticas I, II e III sintetizam o rRNA, mRNA e tRNA (e pequenos RNAs), respectivamente. Cada promotor contém um contexto característico, de pequenas seqüências conservadas, reconhecidas por fatores de transcrição, apropriados às respectivas polimerases^[150]. Os promotores da polimerase I e II, normalmente situam-se a montante do início da transcrição. As regiões promotoras reconhecidas pela RNA polimerase II contem uma organização modular e maior variação na sua seqüência, possuindo elementos regulatórios, **cis-elementos** (*cis-acting*), tipicamente situados nos 200 pb a montante do nucleotídeo +1 da transcrição^[150]. Alguns desses cis-elementos, e os respectivos fatores de transcrição que os reconhecem, estão presentes e atuam em

diferentes genes, são em boa parte constitutivos. Porém, outros cis-elementos são específicos, pertencem a classes particulares de genes. A ocorrência destes elementos regulatórios, constitutivos e específicos, dar-se-á em combinações variáveis destas regiões regulatórias ^[150]. Portanto, os promotores ativados pela RNA Polimerase II, possuem seqüências regulatórias próximas ao códon de iniciação, que determinam se o promotor é expresso todos os tipos celulares ou especificamente regulado. Promotores que são expressos “constitutivamente”, cujos genes são usualmente chamados de “*housekeeping genes*”, são reconhecidos por fatores de transcrição ubíquos. Nenhuma combinação entre **fator de transcrição/elemento regulatório**, é essencial componente de um promotor, sugerindo que a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II pode ser ativada por diferentes maneiras ^[150].

Os autores devem demonstrar que o gene de referência escolhido para a normalização é apropriado para o experimento em questão ^[137, 146, 151]. Existem vários programas disponíveis na Internet que permitem testar múltiplos genes de referência. O *GeNorm* ^[139] possibilita a escolha do gene de referência baseado na variação da média geométrica dos valores de expressão de genes candidatos (<http://www.genomebiology.com/2002/3/7/research/0034/>); O *BestKeeper* ^[152] utiliza o mesmo princípio porém servindo-se de dados brutos (<http://www.genequantification.de/BestKeeper-1.zip>). Um terceiro programa, o *NormFinder* ^[138], não apenas mede a variação de expressão, mas também classifica os genes candidatos a referência através das diferenças intra e intergrupos, ou seja, avalia qual gene sofreu mais interferência das condições experimentais. Por fim, deve-se avaliar se um gene ou mais devem ser utilizados como referência ^[139]. e ainda, se uma certa variação de expressão do(s) mesmo(s) pode ser considerada sem alterar a validação da expressão do gene de interesse e ou o significado biológico ou de diagnóstico ^[146].

g) **Moléculas artificiais** - De forma alternativa RNA sintéticos incorporados em amostras podem ser utilizados como controles internos ^[144]. Esse procedimento pode ser feito pela clonagem ou transcrição *in vitro* em outra espécie e representa um excelente método potencial para normalização de dados de qPCR ^[137]. Uma quantidade conhecida de moléculas artificiais pode ser incorporada na etapa de extração de RNA e estarão sujeitas a todas as nuances experimentais que afetam o RNA de interesse ^[137]. O fato da molécula artificial não ser extraída da célula pode acarretar certos problemas em situações onde as amostras possuem diferenças histológicas, como em tecidos fibrosos, investigações sobre parede celular ^[137]. São necessários ainda mais estudos sobre esta abordagem e, conseqüentemente, a sua padronização para diferentes organismos ^[137]. Uma desvantagem dessa estratégia é o aumento de custos quando comparada com a utilização de genes de referência endógenos.

Existem vários métodos que podem ser adotados para a normalização da qPCR, os quais recomenda-se serem adotados conjuntamente sempre que possível. Uma vez esclarecido o propósito da pesquisa em questão, torna-se fácil a adoção criteriosa dessas medidas. Em geral podemos citar: uniformidade do tamanho das amostras, obter RNA de boa qualidade e utilizar mesma quantidade para a síntese do DNA complementar. A utilização de gene referência, através da introdução de uma molécula artificial parece ser a melhor opção para normalização e estimativa da expressão de genes ^[137]. Essa estratégia ainda não está disponível comercialmente, possivelmente é mais indicada para testes de rotina, padronização industrial e diagnósticos aplicados em larga escala do que para investigação da expressão gênica para estudar e elucidar certos fenômenos biológicos. O uso de genes internos como referência é uma forma simples e apropriada de normalização desde que se tenha um bom gene, podendo até, ser mais de um. Assim, esse e os demais pontos críticos da normalização devem experimentalmente considerados antes de alcançar os resultados da PCR em Tempo Real.

4.2.5 Fungos Micorrízicos Arbusculares

A sofisticada interação mutualística entre plantas e fungos micorrízicos, é um processo co-evolutivo de centenas de milhões de anos que vem afetando o funcionamento e a biodiversidade ambiental (van der Heijden et al., 1998). Simbiontróficos obrigatórios, os FMA só conseguem completar seu ciclo de vida na presença de hospedeiro, o qual fornece carboidratos e outros fatores necessários ao desenvolvimento e esporulação. O processo de infecção que ocorre quando hifas infectivas, provenientes de esporos, hifas no solo ou intra-radiculares, entram em contato com as raízes das plantas, nos espaços intercelulares. Em seguida, a hifa avança para dentro das células corticais internas, onde produz ramificações dicotômicas, chamadas de arbúsculos ^[84, 85]. Embora o fungo esteja localizado fisiologicamente interno à célula do córtex, permanece separado do citoplasma da planta pela membrana peri-arbuscular vegetal, criando-se aí um espaço apoplástico entre os simbiontes onde ocorrem as trocas de nutrientes ^[84]. As hifas são prolongações funcionais do sistema radicular podendo diferenciar-se em intra e extracelulares, sendo estas importantes para a formação de propágulos, esporos e para agregação no solo, capazes de aumentar a disponibilidades de certos nutrientes, em particular do íon fosfato ^[84, 85].

O processo de colonização é controlado, não ocorrendo em regiões meristemáticas e em vasos condutores. Não há colonização de todas as células do córtex, nem formação de arbúsculos em todas as extremidades das hifas intra-radiculares. Entretanto a diferenciação em arbúsculos requer alterações estruturais e metabólicas, tais como a deformação da parede celular fúngica, síntese de membrana plasmática, fragmentação do vacúolo, aumento do volume citoplasmático, rearranjo do citoesqueleto ^[85]. No hospedeiro ocorre ativação e expressão de genes relacionados com absorção de Pi e transporte de sacarose, detectados através do acúmulo de transcritos, atividade enzimática e de proteínas ^[84]. Os aspectos anatômicos e fisiológicos na colonização de raízes por FMA são conhecidos, enquanto as bases moleculares desta simbiose, assim como a absorção de P pelas plantas neste sistema ecológico, não são bem compreendidas e merecem ser estudadas ^[67, 68].

4.2.6 Transportadores de fósforo (PT)

Experimentos usando sistemas de expressão heterólogos demonstram que os transportadores de P de plantas realizam o co-transporte de H^+/P_i , com alta afinidade por fosfato [56,73, 74, 75]. Esses transportadores de P de plantas, juntamente com o *Pho84* de leveduras que foi o primeiro a ser caracterizado [153], e outros simportadores H^+/P_i de fungos [154] estão incluídos na família gênica *Pht1* [69]. A segunda classe de transportadores de P, *Pht2*, possui similaridade de seqüência com o simportador de Na^+/P_i *PHO-84* de *Neurospora crassa* [155] e *PHO89* de *Saccharomyces cerevisiae* [156]. O transportador de baixa afinidade por P de *Arabidopsis*, *Pht2; 1*, embora tenha similaridade com *PHO89*, parece ser um co-transportador de H^+/P_i assim como os ortólogos de archaeobactérias e eubactérias [71]. Este transportador de *Arabidopsis* é expresso nas folhas, independente do status de P_i na planta, provavelmente envolvido no re-alocação de P em órgãos e tecidos verdes [71].

Em *Arabidopsis*, nove genes de transportadores de alta afinidade por fosfato, denominados de *ARATH;Pht1; 1* a *ARATH;Pht1; 9*, participam da absorção e mobilização de P durante o desenvolvimento. Quatro destes são preferencialmente expressos nas raízes sob a privação de P, os outros são expressos em cotilédones, folhas, ramos, flores e grãos de pólen [157]. Em arroz, no cultivar Nipponbare, identificaram-se 13 seqüências de transportadores de P, denominados de *ORYsa;Pht1; 1* a *ORYsa;Pht1; 13* [79]. Dez destes TP de arroz tem expressão variável nas raízes com baixo P na presença ou não de micorrizas, enquanto *OsPT7* e *OsPT8* foram timidamente expressos e *OsPT12* e *OsPT13* não foram detectados via PCR em tempo real [79]. Outros genes de TP foram caracterizados, sendo exclusivamente induzidos em raízes micorrízicas (*SOLtu;Pht1; 3* de batata, Rausch et al., 2001; *MEDtr;Pht1; 4* de *Medicago truncatula*, Harrison et al., 2002; *ORYsa;Pht1; 11* de arroz, [79].

Em 2001, Figueira et al. [158], descreveram cinco clusters de cana-de-açúcar como transportadores de alta afinidade por fosfato. Destes cinco, o cluster SCEQRT1028B07.g, montado por 28 EST, permitiu a predição de uma proteína com 541 aminoácidos,

apresentando a hidropatia e topologia com os 12 domínios transmembranares, características específicas de proteínas transportadores de alta afinidade por fosfato ^[12]. As análises de *Southern*, de dois EST contra duas variedades (SP80-4966 e SP80-180) sugerem a ocorrência de pelo menos 10 cópias de cada um destes TP no genoma de cana-de-açúcar^[78]. Nogueira et al. (2003)^[159] utilizando macro arranjos de EST, observaram a indução por frio do clone SCCCHR1003H07.g de cana-de-açúcar, com alta similaridade com o transportador de fosfato *Pht1;2* de *Oryza sativa*, cultivar indica (AAM14593 NCBI). O seqüenciamento 3' dos clones do cluster SCEQRT1028B07.g sugere que existam isoformas de genes *Pht1* de transportadores de fosfato dentro do próprio cluster ^[78]. A seqüência consensual deste cluster apresenta similaridade >80% com o *OsPT8* e *OsPT12*, sendo moderadamente expresso após 14 dias sem P em hidroponia ^[78]. Está claro que os TP de cana-de-açúcar foram parcialmente caracterizados e carecem de estudos de expressão, principalmente sob influência da colonização com MA.

A quantificação da absorção micorrízica do Pi e a sua importância simbiótica tem surgido como tema de trabalhos recentes paralelamente a identificação de transportadores de fosfato operantes durante desenvolvimento de micorrizas em espécies de plantas. Transportadores de fosfato especificamente expressos, sendo fortemente induzidos ou alterados em raízes micorrízicas têm sido identificados em cereais (*Oryza sativa*) ^[79], solanáceas (*Solanum tuberosum*; *L. esculentum*; *Petunia hybrida*) ^[160, 161, 162] e leguminosas (*M. truncatula*; *Lotus japonicus*) ^[163, 162].

A imuno-localização do transportador de fosfato *MEDtr;Pht1;4* confirmou que a sua expressão ocorreu na membrana celular, ao redor de arbúsculos formados, em raízes de *Medicago truncatula* infectadas com *G. vesiforme* ^[163]. A transformação de batata com o promotor do *SOLTu;Pht1;3* fundido ao gene repórter GUS (β -glucuronidase) demonstrou a sua expressão em células arbusculadas ^[160]. Trabalhos subseqüentes associaram essa expressão a hifas intra-radiculares de MA, não sendo influenciada por infecções patogênicas ^[162]. O transportador de tomate *Pht1;1* é expresso em raízes micorrízicas ou não, porém a

sua localização via hibridização *in situ* demonstrou expressão diferencial na epiderme e pêlos radiculares em raízes não micorrízicas^[74] e células arbusculadas do córtex da raiz ^[161]. Esse resultado sugere o envolvimento do *Pht1;1* de tomate na aquisição micorrízica do Pi.

A comparação da seqüência destes transportadores de fosfato regulados pelo desenvolvimento de micorrizas arbusculares indicou maior similaridade entre os provenientes de tomate (*Pht1;1*) e *Medicago truncatula* (*Pht1;4*), sendo o gene *Pht1;11* de arroz considerado evolutivamente mais distante ^[79].

As análises filogenéticas podem auxiliar na interpretação e predição sobre a possível origem e relações entre os diferentes genes e suas prováveis funções, no caso aqui dos transportadores de fosfato. A similaridade observada entre os transportadores de fosfato *Pht1;4* de *Medicago truncatula* ^[160], *Pht1;4* de batata (nº de acesso YA793559 no GenBank) e o *Pht1;11* de arroz ^[79], os segregam de outros membros da subfamília *Pht1* já descritos, denotando uma possível seleção funcional (Karandashov 2005). É possível que estes três transportadores (*MEDtr;Pht1;4*, *SOLtu;Pht1;4* e *ORYsa;Pht1;11*), induzidos por micorrizas possuam características bioquímicas que os diferem dos demais membros da subfamília *Pht1*. Por outro lado, a maioria dos transportadores de fosfato do tipo *Pht1*, em grande parte provenientes de dicotiledôneas, exibe expressão constitutiva em distintos órgãos como o gene *SOLtu;Pht1;1* ^[57, 161], e agrupam-se em homólogos que apresentam tecido-especificidade sob certos estímulos ^[65].

A expressão do transportador de fosfato *Pht1;11* de arroz esta relacionada com presença de estruturas micorrízicas e, presumivelmente, envolvi a translocação de Pi para planta ^[79]. O transportador de fosfato *MtPT4* é expresso na membrana peri-arbuscular da *Medicago truncatula* ^[91, 163], logo se entende que seja responsável pela aquisição do fósforo absorvido pelo fungo. Assim recentes estudos têm identificado outros transportadores de fosfato similares em plantas micorrízicas ^[164, 165].

Para identificar a função dos nove transportadores de P de Arabidopsis na nutrição de fósforo, Mudge et al. (2002)^[157] isolaram regiões promotoras de cada um e fusionaram aos

genes repórteres β -glucuronidase e/ou "green fluorescent protein" (GFP) e introduzindo via *Agrobacterium tumefaciens* na planta. Os promotores de *Pht1-1*, *Pht1-2*, *Pht1-3* e *Pht1-4* de *Arabidopsis* direcionaram a expressão para a epiderme das raízes, em solos contendo baixa concentração de Pi, de modo semelhante aos TP descritos para tomate *Pht1;1* e *Pht1;2* ^[58], e de *M. truncatula* *Pht1;1* ^[76]. Em um estudo usando genes repórteres coordenados pelos promotores de *ARATH;Pht1;1* e *ARATH;Pht1;2*, se observou a expressão em paralelo de genes quiméricos e genes nativos (*ARATH;Pht1;1* e *ARATH;Pht1;2*) em função das concentrações de Pi no meio ^[166]. Não foram identificadas regiões promotoras que dirijam a expressão específica dos transportadores para as raízes, porém o estudo demonstrou que há dois sistemas de transportadores de alta afinidade operantes: um que atua rápido e especificamente devido a falta de Pi, enquanto o outro age em função da deficiência prolongada de Pi ^[166]. Em *arabidopsis* foram identificados cis-elementos regulatórios em genes de resposta rápida (4 horas) e tardia (28-100 horas) a deficiência de P, os quais podem atuar como elementos cis de regulação, ligando-se a fatores de transcrição ^[167]. Duas seqüências apresentaram uma freqüência significativa ($P < 0,05$) nos promotores de resposta rápida em relação a todos os genes (> 8000) fixados em um microarranjo ^[167]. A primeira seqüência consenso é similar ao elemento PHO ^[168], enquanto o segundo consenso apresenta-se similar ao TATA-box descrito por Rossel et al (2002) ^[169]. Enquanto, quatro outras seqüências regulatórias estão presentes tanto em genes de resposta rápida quanto nos de resposta tardia com freqüências significativas, os quais são possíveis alvos de fatores de transcrição, que aumentam a expressão mediante estresse por P [167, 170] (Quadro 2).

Quadro 2. Genes estudados por Hammond et al. (2003) em microarranjos (n ≅ 8250).

Nome	Seqüência consenso	Genes responsivos a P*				Referências
		(4 h -P)		(28-100 h -P)		
		Nº	(%)*	Nº	(%)**	
PHO- <i>like</i>	C(G/T/A)(C/T/A)GTGG	18	32,1	-	-	[167]
TATAbox- <i>like</i>	TATAAATA	20	35,7	-	-	[167]
PHR1-binding site	GNATATNC	10	16,7	9	17,6	[170]
PHO	CACGT(G/C)	17	28,3	16	31,4	[168]
	ATGCCAT	1	1,7	2	3,9	[168]
Heliz-loop-helix	CA(T/G)(A/C)TG	32	53,3	23	45,1	[168]
NIT2	TATC(A/T)(A/T)	42	70,0	36	70,6	[168]
* Percentual de um total de 60 genes induzidos após 4 horas sem P.						
** Percentual de um total de 51 genes induzidos após 28-100 horas sem P.						

Karthikeyan et al. (2002) ^[166], sugerem que genes repórteres podem ser usados como indicadores da ativação de transcritos de genes expressos sob deficiência de P. A detecção deste fenótipo nas folhas, via gene repórter, seria uma indicação de estresse fisiológico por P e da necessidade de adubação ^[167]. É necessário que o promotor coordene uma resposta exclusiva à deficiência por P, na qual a expressão do gene repórter aumente gradativamente, enquanto a deficiência de P não afete o crescimento da planta. Em *Arabidopsis* este período está entre 24 a 72 horas após a remoção do P ^[167].

Os padrões temporais de expressão gênica cultivando *M. truncatula* inoculada com *G. versiforme*, foram evidenciados em arranjos de cDNA []. Um incremento de expressão de genes de defesa e induzidos por estresse, ocorreu no início do contato entre simbioses e conseqüente decréscimo com o desenvolvimento da simbiose. Em um segundo grupo, contendo genes similares a componentes de vias de transdução de sinais, houve uma expressão tardia associada à colonização das raízes (Liu et al., 2003). Neste trabalho, apenas 3% dos genes nos arranjos de cDNAs demonstraram mudanças na expressão durante o desenvolvimento da simbiose, a maioria foi induzida e teve aumento da expressão, não mostrando sensibilidade ao alto Pi. A fertilização de P também não afetou a expressão de 12 genes de *M. truncatula* induzidos mediante a simbiose com *G. mosseae*

(Brechnmanncher et al., 2003). Estes resultados sugerem que alterações no nível de transcritos estão relacionadas com as interações com o fungo, e não sendo um efeito secundário da nutrição por P (Liu et al., 2003).

Wang et al (2001), estudando a expressão de 1280 genes sob influencia de deficiência de três nutrientes (P, K e Fe), observou a indução do *Ph1;1* de tomate com uma cinética de expressão similar para os três tratamentos nos quais, o gene foi ativado entre 3 e 12 horas após a imposição de deficiência de cada mineral. Nos tratamentos com deficiência de K e Fe houve uma maior indução do *Ph1;1* tomate, do que nos tratamento sem P porém, Liu et al (1998) não observaram o mesmo após cultivo de tomates sem K ou Fe por período de 5 dias. Já o *Ph1;2* de tomateiro, não apresentou expressão significativa em arranjos de cDNA para os tratamentos sem K ou Fe (Wang et al., 2001). Nesse experimento, a expressão do *Ph1;2* foi sensivelmente inferior do que *Ph1;1* no tratamento sem P, estando este último entre os genes com maior acúmulo de transcritos quando comparados com outros de transportadores de K e Zn em tomate (*LeKC1*, *LeIRT1* e *LeHAK5*) [Wang et al., 2001].

Hammond et al. (2003) ^[167], investigando sobre deficiência de fosfato em Arabidopsis, usando a tecnologia de microarranjos, encontraram a expressão diferencial de 49 genes, cem horas após a deficiência de P. Nestes arranjos não se observou a expressão de nenhum dos cinco genes (*At2g02990*, *RNS1*; *At2g32830*, *Ph1;5*; *At3g26570*, *Ph2;1*; *At5g43350*, *Ph1;1*) previamente descritos como induzíveis por deficiência de P. Entretanto, detectou-se baixa presença de transcritos de *Ph2;1* (TP de baixa afinidade) em apenas uma das duas repetições experimentais. Os transportadores de fosfato *Ph1;5* (*At2g3830*) e *Ph2;1* (*At3g26570*), apresentam expressão na parte aérea de plantas de Arabidopsis cultivadas sob deficiência de P (Daram et al, 1999; Mudge et al, 2002; Versam e Harrison, 2002), enquanto o transportador de fosfato *Ph1;1* (*At5g43350*) é expresso apenas nas raízes de Arabidopsis (Muchhal et al, 1996; Mudge et al. 2002). Estes resultados sugerem que a expressão deste transportador de fosfato é transiente na natureza, e pode ser modulada por deficiências de outros nutrientes ou estímulos ambientais. Os estudos acima

demonstram que a expressão de transportadores de fosfato acontece num período entre 12 horas a poucos dias da privação de P, dependendo da espécie.

4.2.7 Validação de expressão em cana-de-açúcar via qPCR

A produção de etanol como fonte de energia renovável, tem sido encorajada em ao redor do mundo sempre que seja de forma sustentável, ecológica e economicamente viável ^[171]. A cana-de-açúcar tem sido selecionada geneticamente nesse sentido, e hoje cultivares industriais possuem flexibilidade para produzir açúcar ou etanol, além de outras aptidões que vão desde a capacidade de gerar energia elétrica até o potencial para fitorremediação ^[172]. Nos últimos anos, projetos de seqüenciamento genômico associados a análises do perfil transcricional buscaram identificar características gênicas de interesse da cana-de-açúcar, com o escopo de incrementar o melhoramento assistido ou a seleção de genes para manipulação genética. Estes estudos têm sido realizados com genes de interesse agrônômico ou com potencial biotecnológico nos mais diversos órgãos ou tecidos na planta, tais como: folhas, meristemas, inflorescência, colmo e raízes, estando correlacionados com importantes processos biológicos como: desenvolvimento, florescimento, acúmulo de açúcar e respostas a estresse bióticos e abióticos.

Este capítulo descreve a análise da variabilidade e estabilidade de expressão de cinco genes classicamente conhecidos como "*housekeeping genes*". Estes genes - *Actina*, *Tubulina*, *GAPDH*, *UbiQ1* e *UbiQ2* - têm sido utilizados como genes normalizadores ou como gene de referência para a validação da expressão de genes de interesse em plantas e animais por diversas técnicas como: RT-PCR, *Northern* e qPCR (PCR em Tempo Real). Logo, o seu perfil de expressão foi estudado para saber se são realmente bons "normalizadores" para serem aplicados como genes de referência via qPCR, em estudos moleculares com diversos tecidos ou órgãos de cana-de-açúcar: meristema, inflorescência, colmo, folha e raízes cultivadas com alto e baixo Pi. A seguir, foi determinada a expressão relativa de alguns genes de interesse, tais como: metalotioneinas tipo I, II e III, e os transportadores

de fosfato *PT7* e *PT8*. Esses genes estão associados ou são expressos em resposta ao o acúmulo de sacarose, estresse oxidativo, absorção e uso do fosfato e tem sido alvo de interesse em diversas plantas, mais recentemente em cana-de-açúcar nos projetos desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA-USP. Em particular, os transportadores de fosfato foram estudados em raízes cultivadas com micorriza ou não após 58 dias pós-inoculação (dpi). E estes resultados relacionados aos do capítulo anterior.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Teste de genes de referência em cana-de-açúcar

4.3.1.1 Material vegetal

Amostras de cana-de-açúcar coletadas de meristema, inflorescência, folha, parênquima do colmo de plantas maduras, crescidas a campo e também de raízes de plantas cultivadas em vasos, sob efeito de alto e baixo fósforo, ou seja, 20 e 200 mg de P kg⁻¹ de substrato (areia vermiculita, 2:1 v/v). As amostras do meristema foram coletadas da variedade SP 87-432; as amostras do colmo foram coletadas da F1 derivada do cruzamento de das variedades SP 80-180 e SP 80-4966; e por fim as amostras de folha e raízes foram coletadas da variedade SP 80-3280. As amostras vegetais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após a coleta e estocadas a -80°C para posterior extração de RNA.

4.3.1.2 Purificação de RNA e síntese de cDNA

O RNA total de cana-de-açúcar foi extraído, a partir de 100 mg das amostras de meristema, inflorescência, folha, colmo e raízes, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), que consiste em uma solução mono-fásica de isotiocianato de guanidina/fenol, baseado no método desenvolvido por Chomczynski & Sacchi ^[173]. Após macerar as amostras em almofariz contendo nitrogênio líquido, adicionou-se 1,0 mL de Trizol seguido de homogeneização por 15 seg, incubação por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida em tubo novo, precipitada com álcool isopropílico por 10 min a 30 °C e centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, o precipitado (*pellet*) de RNA foi lavado em etanol 75% (v/v), agitado por 30 seg e centrifugado a 7.500 g por 10 min a 4 °C. Os RNAs foram dissolvidos em dietil-pirocarbonato 0,01% (H₂O DEPC) e estocados a -80 °C. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de

agarose 1,2%, (m/v) utilizando-se brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para visualização das bandas. A aquisição de imagens dos géis foi feita com câmera digital e as mesmas processadas no programa Kodak Digital Science 1 (Kodak).

A integridade do RNA total foi confirmada eletroforeticamente em gel 1,5 % de agarose e a concentração medida por espectrofotometria a 260 nm. A pureza do RNA foi determinada de acordo com a razão 260/280 nm com valores médios entre 1,8 a 2,0. Cinco microgramas ($5 \mu\text{g}$) do RNA total e 500 ng de óligos dT contidas em um volume de $11 \mu\text{L}$ foram incubados a 70°C por 5 min e em seguida a 4°C por 2 min. Logo após adicionou-se $4 \mu\text{L}$ do tampão de síntese da primeira fita de DNA (MBI Fermentas), $2 \mu\text{L}$ da mistura 10 mM de trifosfato desoxiribonucleotídeos (dNTPs), $1 \mu\text{L}$ (40 U) de inibidor não competitivo de RNase tipo pancreática RNaseOut (Invitrogen) e $1 \mu\text{L}$ (200 U) da enzima transcriptase reversa (RTase) RevertAid M-Mulv (MBI Fermentas), a reação foi incubada a 42°C por 1 h. Para finalizar a RT a temperatura foi elevada a 70°C por 10 min e resfriada a 4°C por 2 min. Em seguida foi adicionado $1 \mu\text{L}$ (5 U) da RNase-H (New England BioLabs) incubando a 37°C por 20 min, e resfriada a 4°C .

4.3.1.3 Desenho de iniciadores

Os iniciadores (*primers*) foram desenhado com auxílio do aplicativo *Primer3* disponível em http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Os limites estipulados de temperatura de anelamento e tamanho do amplicon para seleção de iniciadores foram de 59 a 61°C e de 100 a 250 pb, respectivamente. O par de iniciadores selecionados para cada gene foi testado para: estabilidade, T_m , conteúdo de base CG (%), e interações entre iniciadores (homodímeros e heterodímeros), através do programa *NetPrimer* acessado em http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/_netprlaunch.html. Sempre que possível os iniciadores foram desenhados de forma a situarem-se entre éxons consecutivos, intercalado por um íntron. O que foi possível para metalotioneína. Os iniciadores dos transportadores de fosfato foram desenhado na região 3'UTR. Em geral, nessa região não

traduzida maiores variações de sequência para detecção específica dos genes *PT7* e *PT8*. Os pares de iniciadores para cada gene estão apresentados na Tabela 14, nos Resultados, mostrando as abreviações dos genes, referências, fonte, tamanho dos amplicon. Os genes similares, pertencentes a mesma família ou classe funcional foram alinhados para comparação de sequências através do programa *ClustalW* 1,8 (*BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments*) disponível em <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>. Sempre que conveniente estes alinhamentos resultantes em formato *FASTA-output* foram transformado em arquivos *RTF-new* com a ferramenta *BoxShade* 3.21 disponível em http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.

4.3.1.4 PCR em Tempo Real

As reações de PCR em Tempo Real foram conduzidas com a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema de RotorGene-3000 ^[141]. Cada reação foi preparada com 5 µL do complexo *Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 5µM dos iniciadores senso e reverso e 1 µL da diluição 1:10 de cDNA para servir de molde de DNA para a PCR totalizando um volume final de 10 µL por tubo. O perfil da reação foi estabelecido com duas etapas constantes de: 95°C por 2 min e 50°C por 2 min; seguidas de 45 ciclos de: 95°C por 10 seg, 60°C por 30 seg, desnaturação e anelamento/extensão, respectivamente. Um protocolo de dissociação foi adicionado ao final da termociclagem, ajustado de 72 a 95°C, determinando a curva de dissociação dos produtos da PCR. Todo experimento de PCR em Tempo Real incluiu: amostras em triplicatas; um controle negativo (uma duplicata de reação sem DNA molde) e uma curva padrão de composta de triplicatas de três diluições seriais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) do cDNA. Os dados foram processados no aplicativo *Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0* ^[141].

4.3.1.5 Delineamento experimental e estabilidade gênica

A expressão gênica foi avaliada em triplicatas (3) de cada tecido/órgão (6) para cada gene (n=18) e designada com os seguintes símbolos: meristema (M), inflorescência (I),

folha (F), colmo (C) raízes de plantas cultivadas com alto P (RP+) e com baixo P (RP-). A análise da curva padrão da diluição serial do cDNA de cada gene serviu como referencial para calcularem-se as concentrações gênicas com base em: um modelo de regressão linear, valores logarítmicos das concentrações e com o “*threshold*”, ou seja, o limite de detecção de estabelecido em 10% da fluorescência. Esses valores de concentrações serviram para calcular a variações e a estabilidade de expressão gênica, e assim avaliar os candidatos a genes de referência. Dois aplicativos disponíveis na Internet foram utilizados e avaliados quanto a sua performance, o *NormFinder* e o *GeNorm*. As análises do *NormFinder* fazem uma estimativa da variação da expressão intra e intergrupos, e ainda combina as duas para calcular valores de estabilidade ($Sv = stability\ value$) dos genes candidatos [Andersen et al., 2004]. As análises realizadas com *GeNorm* permitem o cálculo de fatores de normalização para cada amostra tecido/órgão com base na média geométrica do gene testado [Vadensompele et al., 2002]. Para todo o gene analisado o *GeNorm* calcula a variação aos pares, ou seja, analisa a variação de expressão dois a dois de todas as possíveis combinações gênicas deste gene pareado contra os demais candidatos. O algoritmo do programa calcula a variabilidade de um gene com base no desvio padrão da razão de expressão logarítmica de um par de genes, definindo um valor de estabilidade M para cada gene. O valor M é inversamente proporcional à variação de expressão do gene avaliado. Quanto maior o valor razão de expressão logarítmica do par gênico, menor será sua estabilidade de expressão do gene. Após a seleção de um gene, ou genes, para a normalização em cada um dos tecidos avaliados, calculou-se a variação de expressão relativa com auxílio do aplicativo *Relative Expression Software Tool* (REST-2005 version-BETA 1.9.9), de autoria de M. Herrmann & M.W. Pfaffl ^[140, 141] disponível em <http://gene-quantification.info>. A utilização deste programa permitiu uma estimativa de expressão gênica com nível de significância entre genes alvo e gene(s) de referência. O programa realiza testes consecutivos e convergentes para avaliar o grau de incerteza dos valores de expressão gênica obtidos, utilizando randômico e de *bootstrap* ^[174].

4.3.2 Expressão gênica durante simbiose micorrízica entre o fungo *Glomus clarum* e cana-de-açúcar

4.3.2.1 Extração de RNA

Amostras de 500 mg de raízes foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido, e o RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante: ao macerado de raízes foi acrescentado 1,5 mL de Trizol seguido de homogeneização por 15 seg. Em seguida as amostras foram incubadas por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 15 min. A fase líquida foi recolhida em tubo novo, acrescentando-se 300 µL de clorofórmio. Após vigorosa agitação por 15 seg e incubação por 3 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas 12000 x g a 4°C por 15 min. A mistura então se separa em uma fase inferior orgânica contendo fenol, clorofórmio, compostos fenólicos, e uma fase aquosa superior, a qual foi transferida para novo tubo. O RNA foi precipitado com 750 µL de álcool isopropílico por 10 min a 30°C e centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 10 min. Em seguida, o precipitado (*pellet*) de RNA foi lavado em solução 75 % etanol (v/v) livre de ribonucleases, agitado por 30 seg e centrifugado a 7.500 g por 10 min a 4 °C. Os RNAs foram dissolvidos em dietil-piromcarbonato 0,01% (H₂O DEPC autoclavado) e estocados a -80°C.

A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, (m/v) utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para visualização das bandas (Sambrook et al. 1989). A aquisição da imagem dos géis foi feita com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1 (Kodak).

4.3.2.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 2 µg de RNA total, de cada tratamento, 50 ng de iniciadores Oligo-dT (12-18) e H₂O DEPC para volume final de 12 µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 10 min e resfriada em gelo por 1 min. Foi adicionado o tampão da PCR 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 500 µM e

DTT 10 mM. As amostras foram incubadas a 42°C por 5 min, depois adicionou-se 200 U de transcriptase reversa Superscript II. Incubou-se a reação a 42°C por 5 min e em seguida as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 min. Foram adicionadas 2 U de RNaseH por reação, incubando-as por 20 min a 37°C, para a degradação das fitas de RNA dos híbridos de cDNA:RNA formados. As soluções de cDNA foram armazenadas a -20°C.

O cDNA obtido foi testado com amplificações via PCR realizadas nas seguintes condições: solução tampão PCR 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 4 mM MgCl₂, 3 mM dNTPs 0,1 µM de iniciadores específicos de peroxidase e 1 U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo de desnaturação: 94°C por 3 min; 35 ciclos de amplificação: 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min; e com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram fracionados eletroforéticamente em gel 1x de tampão SB (10 mM hidróxido de sódio, pH ajustado para 8.5 com ácido bórico) ^[176] e 1,2 % de agarose.

4.3.2.3 Amplificação do DNA e cDNA pela reação em cadeia da polimerase

Para a amplificação do fragmento dos genes que codificam para os transportadores de fosfato PT6, PT7 e PT8, e mais a peroxidase foram utilizado o oligonucleotídeos iniciadores específicos, conforme a Tabela 13, sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen, Califórnia, USA) e Prodimol Biotecnologia S.A. (Belo Horizonte, MG). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 3 mM, iniciadores Perox R e F 10 pmol, 10 ng de DNA vegetal ou cDNA dos tratamentos e 1 U de Taq-DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclo a 94°C por 2 min, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 1 min a 72°C e uma extensão final por 5 min a 72°C.

4.3.2.4 Análises de expressão via qPCR

Os cDNAs gerados foram amplificados por qPCR em solução comercial PlatSybr qPCR de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 1 µL de cDNA diluído 10 x e 5 pmol de

oligonucleotídeos iniciadores, sense e antisense, de cada gene. As condições da amplificação foram as seguintes: 2 min a 94°C, 45 ciclos de 45 seg a 94°C, 11 seg a 60°C, 30 seg a 72 °C e uma extensão final por 5 min a 72 °C. A amplificação foi realizada no aparelho Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) com detecção da fluorescência emitida a cada ciclo da PCR. A cinética das reações foram registradas e as curvas do aumento de cópias do cDNA original foram geradas pelo software Rotor-Gene Real-Time versão 6.0, que fornece os valores de ciclo-limite de leitura (Ct), eficiência da PCR (E) e valores de R^2 . A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo proposto por Pfaffl (2002)^[140] com auxílio do programa REST-2005 (Corbett Research) ^[141].

4.3.3 Southern não radioativo

4.3.3.1 Purificação de fragmentos

Os fragmentos amplificados via PCR (item 4.3.2.3) dos genes *PT6*, *PT7*, *PT8* e *Perox* foram cortados do gel, com cerca de 300 mg utilizando uma lâmina de bisturi nova, e extraídos com o Kit de purificação de DNA GFX (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Os sedimentos de DNA purificado produzidos foram eluídos em 30 µL de água mQ estéril e uma alíquota de 5 µL foi aplicada em gel de agarose 1,7 % para eletroforese e diagnóstico da purificação. A concentração de DNA de cada purificação foi determinada indiretamente pelo programa Kodak Digital Science 1D, sendo então confeccionadas diluições para a concentração de 10 ng µL⁻¹ para utilização nas reações de marcação de sondas.

4.3.3.2 Marcação de sonda

A reação de marcação das sondas utilizou o sistema não-radioativo AlkPhos Direct (GE Healthcare). Na reação, amostras de 50 ng de DNA purificado e desnaturado de cada fragmento purificado (*PT6*, *PT7*, *PT8* e *Perox*), foram incubados a 37°C por 30 min conforme

instruções do fabricante e marcados via ligação covalente da enzima fosfatase alcalina ao DNA fita simples.

4.3.3.3 Hibridização e detecção de sinal

Dez µg de DNA genômico de cana-de-açúcar foram digeridos a 37°C por onze horas com as seguintes enzimas: *EcoR* I, *Hind* III e *Xba* I. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% em SB por 15 horas a 1,5 volts cm⁻¹. Em seguida, o gel foi tratado com solução de depurinação (0,25 M HCl) por dez min, desnaturado com duas lavagens em solução com 1,5M NaCl e 0,5M NaOH, e neutralizado com 1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 7,0. A transferência por capilaridade do DNA para a membrana náilon foi favorecida pelo tampão salinos 10X SSC, durante 16 horas. Após a transferência, a membrana foi seca (30 min 80°C) e o DNA fixado com tratamento de UV calibrado a 70.000 µJ cm⁻² de membrana, usando o programa padrão do transiluminador de ultra-violeta Hoffer UVC 500 (GE Healthcare). A pré-hibridização transcorreu a 60°C por 60-90 min, utilizando o kit AlkPhos Direct como descrito anteriormente. A hibridização a 65°C, percorreu durante a noite (15 h) utilizando 5 ng mL⁻¹ de sonda marcada com a fosfatase alcalina. A geração do sinal para detecção utilizou a fosfatase alcalina ligada a sonda, para catalisar a decomposição, durante 5 min, do substrato estável dioxetano, o CDP-Star (GE Healthcare). A energia luminosa gerada possui uma fase lag curta o que possibilitou a rápida detecção do sinal via sensibilização do Hyperfilm ECL (GE Healthcare), com apenas uma hora de exposição. A revelação em câmara escura foi realizada com processadora automática (MacrotecMX-2), com solução reveladora e fixadora RP X-Omat (Kodak, S. J. Campos, Brasil). A sonda foi então removida tratando a membrana com 0,5% SDS (p/v) a 60°C por 1 hora, seguido de lavagem com 100mM Tris, pH 8,0. A membrana úmida foi guardada a 4°C em saco plástico até a próxima hibridização.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Seleção de genes

A primeira parte desse capítulo focaliza a avaliação de genes para serem utilizados como referência na quantificação relativa em análise da expressão gênica de cana-de-açúcar. Com esse propósito foram avaliados cinco genes de funções básicas (*housekeeping genes*) de cana-de-açúcar (genes/proteína): *Actina* (β -actina), *Tubulina* (Tubulina β -2/ β -3), *GAPDH* (gliceroaldeido-3-fosfato desidrogenase/citossólica) e as poliubiquitinas (*UbiQ*) 1 e 2, os quais são expressos em vários tecidos ou órgãos de cana-de-açúcar e encontrados em diversas bibliotecas de EST do projeto genoma da cana-de-açúcar, o SUCEST ^[142], como ilustra a Tabela 13. Utilizando a ferramenta *Gost* (*Gene Ontology Blast Service*), disponível no sítio <http://www.godatabase.org/cgi-bin/gost/gost.cgi>, identificaram-se os nomes das respectivas proteínas dos genes candidatos à referência, ou seja, das seqüências dos TCs de *housekeeping-genes* de cana-de-açúcar.

A exceção foi o gene da *UbiQ1*, o qual não foi detectado em todas as bibliotecas de EST do SUCEST, porém sua inclusão nessa avaliação permitiu se obter dois candidatos da mesma classe gênica porém, com perfis de expressão diferenciados entre si. A *UbiQ2* aparenta ser predominantemente expressa em raízes ^[175]. Ambas as poliubiquitinas, *UbiQ1* e *UbiQ2*, predizem as respectivas seqüências de aminoácidos ortólogas às encontradas em outras plantas ^[175]. As buscas dos ortólogos das *UbiQ1* e *UbiQ2* de arroz dentre seqüências de cana-de-açúcar no banco de dados *The Institute for Genomic Research* (TIGR) com auxílio da ferramenta *Basic Alignment Sequence Tool* (BLAST), retornou os genes potências TC56495 e TC56667, designados por identidade como *UbiQ1* e *UbiQ2* respectivamente. Esse resultado está ilustrado no alinhamento múltiplo das ubiquitinas de arroz e as respectivas seqüências dos TCs de cana com melhor classificado via BLAST (Figura 8). As

Figura 8. Alinhamento múltiplo de seqüências (Continuação).

```

SC_UBIQ2      974  AAGACCCTCACTGGCAAGACTATCACGCTTGAGGTTGAGTCTTCTGACACGATCGACAACGTCGAAGGCCAAGAT
TC56643      99   AAGACCCTCACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTTGAGTCTCTAGACACTATGACAAATGTCAAGGCATAAGAT
Rubq1        244  AAGACCTTGACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTCGAGTCTCTGACACCATTGACAATGTCAAGGCCAAGAT
Rubq2        244  AAGACTCTGACCGGCAAGACTATCACCTTGAGGTGGAGTCTTCTGACACCATCGACAACGTCAAGGCCAAGAT
TC56576      139  AAGACCCTGACCGGCAAGACTATCACCTTGAGGTGGAGTCTTCTGACACCATTGACAACGTCAAGGCCAAGAT
SC_UBIQ1     371  AAAGACTCTACGGCAAGACAATACACTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATCGACAATGTCAAGGCCAAGAT
consensus    841  AAgACccTgActGGCAAGACTATcAcCtTgAGGTTgAGTctTctGACACCAtcGACAA GTcAAGGCCaAGAT

SC_UBIQ2     1021 CCAGGACAAGGAGGGAATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCAC
TC56643      173  CCAGGACAAGGAAGGCATTCCTCCGGATCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCCGAC
Rubq1        318  CCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCAC
Rubq2        318  CCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCAC
TC56576      213  CCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCAC
SC_UBIQ1     445  TCAGGATTAAGGAGGGCATTCCTCCCGGATCAGCAGAGGCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTAGAGGATGGCCGAC
consensus    914  cCAGGAcAAgGAgGGcATcCCcCCgGAcCAGCAGcG CTcATCTT GcTGGCAAGCAGCT GAgGAtGGccGcAc

SC_UBIQ2     1096 CCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTTACCTTGTGCTCAGGCTCAGGGGTGGCATGCAATCTT
TC56643      248  CCTAGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGAGATCTT
Rubq1        393  CCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGAGATCTT
Rubq2        393  CCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTGTCTCCGCTCCTCGTGGTGGCATGAGATCTT
TC56576      289  GCTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTGTGCTCCTCCGCTCAGGGGTGGCATGAGATCTT
SC_UBIQ1     520  CCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCTACCCTCCACCTGTCTTGGCTCAGGGGTGGCATGAGATCTT
consensus    986  cCTaGcTgACTACAACATCCAGAAGGAGTccACcCTcCACCTtGTgcTc GgCTCaGgGGTGGcATGCAgATCTT

SC_UBIQ2     1171 TGTCAAGACCCTCACTGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAGTCTCTAGACACCATTGACAATGTCAAGGCCA
TC56643      323  CGTCAAGACCCTCACTGGCAAGACTATCACCTTGAGGTTGAGTCTTCTGACACGATCGACAACGTGAAGGCCA
Rubq1        468  CGTCAAGACCCTGACTGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACAATGTCAAGGCCA
Rubq2        468  TGTCAAGACACTGACCGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAACTCTCTGACACCATCGACAACGTCAAGGCCA
TC56576      364  CGTCAAGACCCTGACTGGCAAGACTATCACCTTGAGGTGGAGTCTCTGACACCATCGACAACGTCAAGGCCA
SC_UBIQ1     595  TGTCAAGACATTACAGGCAAGACATCACCTTGAGGTGGAGTCTCTGACACTATCGACAATGTCAAGGCCA
consensus    1061 GTcAAGACccTgActGGCAAGAcATcAcCtT GAGGTgGAgTctTctGACACCAtcGACAA GTcAAGGCCa

SC_UBIQ2     1245 AGATCCAGGACAAGGAAGGCATTCCCCCGGACCAGCAGAGGCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
TC56643      397  AGATCCAGGACAAGGAGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
Rubq1        542  AGATCCAGGACAAGGAGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
Rubq2        542  AGATCCAGGACAAGGAGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
TC56576      437  AGATCCAGGACAAGGAGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGGCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
SC_UBIQ1     669  AGATTTCAGGATAAGGAGGGCATTCCACCGGACCAGCAGAGGCTCATATTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCC
consensus    1132 AGATcCAGGAcAAGGAgGGcAT CCcCCgGACCAGCAGcG CTcATcTT GC GGCAAGCAGCTcGAGGATGGcc

SC_UBIQ2     1320 GTACCCCTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGCAGA
TC56643      472  GCACCCTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCACTCTCCACCTTGCTGCTCAGGCTCAGGGGTGGCATGCAGA
Rubq1        617  GCACCCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTTGCTGCTCAGGCTCAGGGGAGGCATGCAGA
Rubq2        617  GGACCCTTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCAACCTTCACTTGTCTCTCGTCTCAGGGGAGGCATGCAGA
TC56576      512  GTACTCTTGCTGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTTGCTGCTGCGCTCAGGGGAGGCATGCAGA
SC_UBIQ1     744  GCACCCTGCTGACTATAATATCCAGAAGGAGTCTACCCTGCATCTGGTCTTACGCTCTCAGGCTGGCATGCAGA
consensus    1203 GcACcCTtGCTGAcTAcAAcATcCAGAAGGAGTccACcCTcCAccT GTgcTc GgCTCaGgGgAGGcATGCAgA

SC_UBIQ2     1395 TCTTCGTCAAGACCCTCACTGGCAAGACTATCACGCTTGAGGTTGAGTCTTCTGACACGATCGACAACGTGAAG
TC56643      547  TCTTCGTCAAGACCCTCACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTTGAGTCTCTGACACCATTGACAATGTGAAG
Rubq1        692  TCTTCGTCAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACAATGTGAAG
Rubq2        692  TCTTCGTCAAGACTCTGACCGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAGTCTTCTGATACCATCGACAATGTGAAG
TC56576      587  TCTTCGTCAAGACCCTTACTGGCAAGACTATCACCTTGAGGTTGAGTCTCTGACACCATTGACAACGTGAAG
SC_UBIQ1     819  TCTTTGTTAAGACCTTACTGGCAAGACTATCACCTTGAGGTTGAGAGCTCTGACACATTGACAACGTGAAG
consensus    1276 TCTTcGTcAAGAcCCT AcTGGcAAGAcATcACccTtGAGGTgGAGTccTC GAcAcATcGACAA GTgAAG

SC_UBIQ2     1469 GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCAATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
TC56643      621  GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
Rubq1        766  GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
Rubq2        766  GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
TC56576      661  GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCACTGACCAGCAGCGTCTATCTTCGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
SC_UBIQ1     893  GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCACTGATCAACAGCGCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGAT
consensus    1347 GCcAAGATcCAGGAcAAGGAGGGcATcCCcCCgGAcCAGcAGCGtCTcATCTT GcTGGcAAGCAGCTgGAGGAT

```

Figura 8. Alinhamento múltiplo de seqüências (Continuação).

```

SC_UBIQ2 1544 GGCCGCACCCCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTCCACCTTGTGCTCAGGCTCAGGGGTGGCAT
TC56643 696 GGCCGCACCCCTGGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTGTCTCCGCTTCGGTGGGTAT
Rubq1 841 GGCCGCACCCCTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTCTCAGGCTCAGGGGTGGGAT
Rubq2 841 GGCAAGCACCCCTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTTGTGCTCCGCTTCCTTGGTGGTAT
TC56576 736 GGCCGCACCCCTTGGCAGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTTGTGCTCCGCTTCAGGGGTGGCAT
SC_UBIQ1 968 GGACGCACATTGGCTGATTACAATATCCAGAAGGAATCCACTCTTCATCTTGTCTCGCTCTTAGAGGAGGGAT
consensus 1421 GGcGcACcTgGcTGAcTACAATCCAGAAGGAgTccACcCT CAcCT GTgCTccGcCT aGgGGtGG AT

SC_UBIQ2 1618 GCAGATCTTCGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACAATGT
TC56643 770 GCAGATCTTCGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACAATGT
Rubq1 915 GCAGATCTTCGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATTACCCTTGAGGTTGAGTCTCTGACACATTATTGACAACGT
Rubq2 915 GCAGATCTTGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATTGACAACGT
TC56576 810 GCAGATCTTGTCAAGACATTGACTGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATTGATAATGT
SC_UBIQ1 1042 GCAGATCTTCGTCAAGACATTGACTGGCAAGACCATCACACTTGAGGTGSAGAGCTCTGATAATTGACAATGT
consensus 1491 GCAGATCTTcGTcAAGAcCcT AcTGGCAAGACCATcAcCcTgGAGGT GAG cTcTGAcAcATtGAcAATgT

SC_UBIQ2 1693 GAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTGTCTGGCAAGCAGCTTGA
TC56643 845 GAAGGCGAAGATCCAGGAATAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTTATCTTGTCTGGCAAGCAGCTTGA
Rubq1 990 GAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTGCCTGGCAAGCAGCTTGA
Rubq2 990 CAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTGCCTGGCAAGCAGCTTGA
TC56576 885 CAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTGCCTGGCAAGCAGCTTGA
SC_UBIQ1 1119 CAAGGCGAAATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCACTGACCAACAGCGCTCATCTTGTCTGGCAAGCAGCTTGA
consensus 1562 AAGGCGAAgATCCAGGAcAAGGAGGGCATCCCCcGgACCAGcAGCAGTcTcATCTT GcTGGcAAGCAGCTgGA

SC_UBIQ2 1768 GGATGGCCGCACCCCTGGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTGTCTCCGCTTCGGGTG
TC56643 920 GGATGGCCGCACCCCTGGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTGTCTCCGCTTCGGGTG
Rubq1 1065 GGATGGCCGCACCTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTTCCTCAGGCTCAGGGGTG
Rubq2 1065 GGATGGCCGCACCCCTTGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTGTCTCTCCGTCTGGT
TC56576 960 GGATGGCCGTACCCTCGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTCACCTGGTGTCTCCGCTTCAGGGGTG
SC_UBIQ1 1194 GGATGGCGCACCTTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAATCCACTCTTCATCTTGTCTCTCGCTCTTAGGGGG
consensus 1635 GGATGGcCGcACCcTgGcTGAcTACAACATCCAGAAGGAgTccACcTtCAcTgTgTCTccGcCT GgGGtG

SC_UBIQ2 1842 GTATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACA
TC56643 994 GTATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTCAGCGGCAAGACCATCACCTTGGAGGTGGAGTCTCTGACACCATTGACA
Rubq1 1139 GTATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCCTTGAGGTTGAGTCTCTGACACATTGACA
Rubq2 1139 GTATGCAGATCTTCGTCAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCCTTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATTGATA
TC56576 1034 GCATGCAGATATTGTCAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCCTTGGAGGTTGAGAGCTCTGACACCATTGACA
SC_UBIQ1 1268 GCATGCATATCTTGTCAAGACCCTTACTGGCAAGACATCACGTGGAAAGTGAGAGCTCTGACACCATTGACA
consensus 1707 GtATGCAGATcTTCGT AAGAcCcTgAcTGGcAAGAcATcAcCcTgGAgGT GAG cTcTGACAcAT GAcA

SC_UBIQ2 1917 ATGTGAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGGCAAGCAGC
TC56643 1069 ATGTGAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGGCAAGCAGC
Rubq1 1214 ACCTGAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTGTCTGGAAGCAGC
Rubq2 1214 ATGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGGATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGC
TC56576 1109 ACCTGAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGTATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGGCAAGCAGC
SC_UBIQ1 1343 ATGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAAGGAAGGGATTCCTCCAGATCAGCAGAGGCTCATCTTTCGCTGGGAAGCAGC
consensus 1777 AtGTGAAGGCGaAGATCCAGGACAAGGAGGGcATcCCCCgAcCAGCAGcGtCT ATCTTcGC GGCaAGCAGC

SC_UBIQ2 1992 TGGAGGATGGCCGCACCCCTGGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTCCACCTGGTGTCTCCGTCTCCGT
TC56643 1144 TGGAGGATGGCCGCACCCCTGGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACTCTCCACCTGGTGTCTCCGTCTTCGT
Rubq1 1289 TTGAGGATGGCCGCACCTTGGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTCTCTCCGTCTCCGT
Rubq2 1289 TGGAGGATGGACGCACCCCTCGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCTCCACCTGGTGTCTCCGTCTCCGT
TC56576 1184 TGGAGGATGGCCGTACCCTTGCAGACTACAATATCCAGAAGGAGAGCACCTCCACCTGGTGTCTCCGTCTCCGT
SC_UBIQ1 1418 TTGAGGACGGGCGCACCTTGGCAGATTACAACATCCCAAGGAATCCACTCTTCATCTCTCTGCGCTCCGT
consensus 1850 TgGAGGAtGGcCGcACCtGgCaGAcTACAATcATCCAgAAGGAgTcCAcTCTcCAcTgTgTcCG CTcCGT

SC_UBIQ2 2066 GGTGGCCAGTAAGT--CCTGGGCCAT--G--AGCAGCTGTCTTCCAGGGT--TCACAA--GTCTGGTG-----
TC56643 1218 GGTGGCCAGTAAGT--CCTGGGCCAT--G--AGCAGCTGTCTTCCAGGGT--TCACAAAGTNCNTTGGNGGNNNT
Rubq1 1363 GGTGGCCAGTAAGT--CCTCAGCCAT--GG--AGCTGCTCTGTCTTGGGT--TCACAA--GTCTG-----
Rubq2 1363 GGTGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGGT--GG--AGCTGCCAGTGTGCCTGCTCATCCGA--GCCTCTGTT-----
TC56576 1258 GGTGGTCAGTAAGC--CATGGGTCT--TTAAGCTGCTGTGTACCTGCT--CT--GTCTGGTG-----
SC_UBIQ1 1492 GGTGGCCGT--GTAAATGAGGAGTAAATGTGCTCTGCTGCAAGCTTATTAAAA--TTCTATG--TGATAGT
consensus 1923 GGTGGcCagTaaGt cctggggccat g AgctGctgtT TtCc gggT tcacaa gtcTGgtg

```


SC_UBIQ2 2125 -----CCGTCCTTCGTGCTCCCTCCGATGCGAGATTATCTGCATGTC--GTGGTGTGTGTCCT-GATCGAGT
 TC56643 1286 TTTTGGGGNCCCACATCTTCTGTCTCCCTCCGATGCGAGATTATCTGCATGTNC--GTGGTGTGTGTCCT-GATCGAGT
 Rubq1 1420 -----CCATGTGCT-TCCG--C-AATGCAGCTA--TGGTTGTG--TGGTCTGGTCCTTGCTCGTGT
 Rubq2 1427 -----CGTCAAGTATTGT--GGTGCTGATG-TCTACTTGTGT--CTGGTTTAAATGGACCATCGAGT
 TC56576 1315 -----CCCTCTGGTGTACTCCATTGTCTGGTTGTCTCTATTAA--GTA-TCT-GTGGT---TTCTGT
 SC_UBIQ1 1364 -----GGACAGACATATCCAGTTCTA-C--TAAGTGCTT--CGTCATGTAAACTTTGTAT-ATCCA-GTTCCTCT
 consensus 1980 cCaTcttctgTccctcc gatgg GaTtatctgc tgTg gTggTct gTctt gaTcgaGT

SC_UBIQ2 2184 CGT-CGTTGAGTCCCTATGTTTTTCTTCAAGAAATGT-GAGTCCCT--ATGTCAGTCTGCTTGCCT-TTCTGAA
 TC56643 1357 CGT-CGTTGAGTCCCTATGTTTTTCTT
 Rubq1 1473 CC-CGTT--TCAATTGTGTACTATTACCTGTAAATGT-GTATCCTT-AAGTCTGGTTTGTATG-GT-GTCTGAA
 Rubq2 1484 C--CGTA--TGA-TATGTTAGTTTAA--TGAACA-GTTTCCGT-TGGGACAGCAGTATG-CT-TTATGAA
 TC56576 1408 CATGATGCTG-TGACTGAGTTTGG-TTTAAAGGACCGGTTGTGTCTCTGTGTGTGTGATACCTAAACTGTTCTGCA
 SC_UBIQ1 1427 AA-GTGTTTCTGCTG-TGTAAACTTCTATATAACTTGT-GTAAACTTTATATATAGCTTGTTCCTGT-TCGTACT
 consensus 2036 cgt cGTtg gTcacTatggt t T Ta atgaaatgt gtgtcct atgtatggct gtt ggt ttgtgaa

SC_UBIQ2 2252 CATTCTCTGCTGCTGAGCAGCAGTTTGGTTGGAACTGTGCAATCAATAAATGGAACCTTGCTTCTTGGTTATCTG
 TC56643
 Rubq1 1528 ACCTTTTGTGTGTCTAGAGCAGCATGGAAG-AACTAT--AATGAAT--AAGTGATCCCTAATCATTSTGTCCAA
 Rubq2 1546 TAAAGTTGGAT-TTGAACCTAAATATGTGCTCAATTGTGCTATTAAAAAGTTTGTGTCAATATGTTTTTTCTGTT
 TC56576 1497 GCAGTATGGC-TTCATCATGAATAAGTTTG-ATGTTTGAACCTTTC--ATCTCATTCTCTGTGAGTGTTTATTG
 SC_UBIQ1
 consensus 2098 g t tg t ttgagca agtatg g aa t t aat aa a tga cctggg att ttt gtg

SC_UBIQ2 2327 TGTGTTAGCTAATATTTTTTGAAGTGGGAAGCTCTAATCTTCTATCGCGTTGCT
 TC56643
 Rubq1 1578 AAAAAAATAAAAAA
 Rubq2 1620 AGTT--GCAAGTTTGAAATCTGTCATATTCTTATTAAACGGCA--
 TC56576 1550 TATGCTCTCTAATATTTGCTCTATC--
 SC_UBIQ1
 consensus 2145 gtg qc aatgt a a t

Os genes alvo de interesse desse estudo de cana-de-açúcar são: metalotioneínas tipo I, II e III, escolhidas com base na classificação proposta por Figueira et al. (2001)^[158] e os transportadores de fosfato identificados por Almeida R.S. (2003)^[78], aqui designados *PT7* e *PT8*, os quais são ortólogos dos genes *ORYsa;Pht1;7* e *ORYsa;Pht1;8* de arroz ^[79]. A Tabela 14 apresenta a lista dos genes objeto deste estudo de normalização e expressão gênica de cana-de-açúcar via qPCR, identificados pelos respectivos símbolos, conjunto de iniciadores, código de TC do bando de dados internacional TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/tqi/index.shtml>), tamanho do amplicon e descrição de íntrons.

Tabela 13. Perfil de expressão de “housekeeping genes” nas bibliotecas de cana-de-açúcar do SUCEST

Biblioteca EST	Descrição	Reads por biblioteca	Número de reads e percentual por biblioteca				
			<i>Actina</i>	<i>Tubulina</i>	<i>GAPDH</i>	<i>UbiQ1</i>	<i>UbiQ2</i>
AD1	<i>in vitro</i> amostragem de plântulas infectadas <i>G diazotrophicans</i>	14701	5 (0,03%)	1 (0,01%)	9 (0,06%)	2 (0,01%)	7 (0,05%)
AM1	Meristema apical de plantas jovens	10881	1 (0,01%)	5 (0,05%)	5 (0,05%)	-	6 (0,06%)
AM2		13403	4 (0,03%)	1 (0,01%)	10 (0,08%)	-	3 (0,02%)
CL6	Amostragem de <i>calli</i> tratados à 4 °C e 37 °C por 12 h no escuro	5518	-	2 (0,04)	6 (0,11%)	-	1 (0,02%)
FL1	Flores coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento	15343	2 (0,01%)	8 (0,05%)	7 (0,05%)	-	2 (0,01%)
FL3		10727	2 (0,02%)	6 (0,06%)	15 (0,14%)	1 (0,01%)	7 (0,07%)
FL4		13964	4 (0,03%)	6 (0,04%)	14 (0,10%)	-	1 (0,01%)
FL5		7744	-	1 (0,01%)	6 (0,08%)	1 (0,01%)	3 (0,04%)
FL8		4652	1 (0,02%)	1 (0,02%)	5 (0,11%)	-	4 (0,09%)
HR1		9721	2 (0,02%)	5 (0,05%)	5 (0,05%)	-	3 (0,03%)
LB1	Gemas laterais de plantas adultas	5879	-	2 (0,03%)	3 (0,05%)	1 (0,02%)	4 (0,07%)
LB2		8953	-	3 (0,03%)	9 (0,10%)	-	3 (0,03%)
LR1	Cartucho foliar de plantas imaturas	11701	2 (0,02%)	4 (0,03%)	9 (0,08%)	-	5 (0,04%)
LR2		3418	-	1 (0,03%)	7 (0,21%)	1 (0,03%)	2 (0,06%)
LV1	Folhas estioladas de plântulas <i>in vitro</i>	4557	-	2 (0,04)	7 (0,15%)	-	1 (0,02%)
RT1	Ápice de raízes com 03 cm de plantas madura	7255	-	-	9 (0,12%)	-	4 (0,06%)
RT2		10606	2 (0,02%)	-	10 (0,09%)	-	3 (0,03%)
RT3		7441	-	2 (0,03%)	19 (0,26%)	1 (0,01%)	3 (0,04%)
RZ1	Colo região entre raiz e colmo de plantas jovens	2831	1 (0,04%)	2 (0,07%)	-	-	3 (0,11%)
RZ2		5031	-	-	1 (0,02%)	-	3 (0,06%)
RZ3		12862	2 (0,02%)	7 (0,05%)	11 (0,09%)	-	12 (0,09%)
SB1	Stalk bark from mature sugarcane plants	13189	4 (0,03%)	12 (0,09%)	16 (0,12%)	-	7 (0,05%)
SD1	Sementes em desenvolvimento	8601	1 (0,01%)	1 (0,01%)	10 (0,12%)	2 (0,01%)	26 (0,30%)
SD2		8505	-	-	5 (0,06%)	-	12 (0,14%)
ST1	Primeiro e quarto internódio de plantas imaturas	6933	1 (0,01%)	2 (0,03%)	10 (0,14%)	-	6 (0,09%)
ST3		8939	-	8 (0,09%)	4 (0,04%)	3 (0,03%)	5 (0,06%)

Tabela 14. Resumo dos *housekeeping* e genes alvo investigados Os genes de cana-de-açúcar ortólogos aos que codificam as proteínas de arroz β -actina (Actina) Tubulina β -2/ β -3 (Tubulina) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/citossólica (GAPDH) e as poliubiquitinas 1 e 2 (UbiQ) e dos genes de interesse (metalotioneínas (MT) transportadores de fosfato (PT) e peroxidase de fluido intracelular de raiz (Perox) estão listadas com seus respectivos símbolos seqüências de iniciadores número de acesso e tamanho do amplicon O acesso é o número de identificação da seqüência de *tentative cluster* (TC) no índice de genes de cana-de-açúcar do *Institute of Genomic Research* (<http://www.tigr.org>)

Símbolo do gene	Iniciadores		TC nº	Amplicon (pb)	Íntron
	Sence	Antisense			
<i>Actina</i>	CTCAACCCCAAGGCTAACAG	GGCATGAGGAAGGGCATAA	TC23717	195	?
<i>GAPDH</i>	CCGTCAACGACCCCTTCAT	GCAGCCTTGCTCTTGTCAGT	TC64714	236	?
<i>Tubulina</i>	CTCCACATTCATCGGCAACTC	TCCTCCTCTTCTTCCTCTCG	TC48524	103	?
<i>UbiQ1</i>	AGCCTCAGACCAGATTCCAA	AATCGCTGTCGAACTACTTGC	TC56495	158	-
<i>UbiQ2</i>	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	TCCAACCAAAGTCTGCTC	TC56667	159	-
<i>MTI</i>	AAGTACCCTGACCTGGAGGAG	TGCATATCATCGGTCTTCGTT	CA287650*	208	-
<i>MTII</i>	GCGAGCTTCGTGTTCTTGTT	TGATGAGAGTCTGGGTGGTG	TC48398	179	+
<i>MTIII</i>	ACTAAGCTCGACCGTACCAA	TCCTCCTCAACGATCTCCAC	TC57180	164	+
<i>PT6</i>	CGGACAAGGCAGGTTGAG	GTCGTAGGCGTCGGTGAA	TC278	144	-
<i>PT7</i>	CGCAACTCGCTGTTCTCTC	CGCCAGACATCTCCTCCA	TC61525	103	-
<i>PT8</i>	GCCTGCTGCCTCTGTTC	CGTAACCGCCTGATTGAC	TC 164	106	-
<i>Perox</i>	CTTTCCTCCAAGAACCTCA	CAGTTGCGCCTGATCTCG	TC50215	468	+

*Não foi encontrado um TC correspondente ao *MT1* logo foi apresentado o número de acesso do EST encontrado no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) TC -número de acesso no TIGR; pb - pares de bases

No estudo de genes expressos em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por FMA foi incluída uma peroxidase diferencialmente expressa identificada por Souza (2006)^[98]. A atividade dessa peroxidase apoplástica foi maior em raízes colonizadas e cultivadas em baixo teor de P, quando comparada aos controles não-inoculados. Com base na seqüência parcial de aminoácidos dessa peroxidase, um fragmento de seu gene (POX1, TC50215) clonado desenharam-se iniciadores específicos para análises de expressão via qPCR.

4.4.2 Normalização da expressão gênica em qPCR

Certas variáveis devem ser controladas, ao se trabalhar com a quantificação expressão gênica via tempo real. Dentre as variáveis mais comuns podemos citar a

quantidade do material inicial, anelamento de iniciadores, eficiência enzimática e as diferenças entre tecidos, órgãos e células quanto a atividade de transcrição como um todo. Uma outra escala de normalização tipicamente utilizada é a quantidade de massa do RNA, especialmente para análises de *Northern*, que quando admitido não leva em consideração a qualidade do RNA e a eficiência da reação enzimática. Para avaliar a performance do aplicativo REST de quantificação de expressão gênica foram testadas diferentes concentrações de cDNA para exaltar extremas variações na RT, os resultados observados apresentarão mínimas variações de expressão gênica não significativas ^[140].

A primeira etapa da normalização foi a análise eletroforética do RNA das amostras seguida da determinação da concentração e pureza, para então fixar a quantidade RNA (μg) destinada a síntese do cDNA. Em seguida os iniciadores de cada gene foram testados variando-se a temperatura, concentração de MgCl_2 , e a concentração dos próprios iniciadores. A quantificação relativa foi determinada conforme a fórmula proposta por Pfaffl et al. (2002)^[140]. O Método considera a média dos desvios de Ct do controle e grupo de genes de interesse, normalizados com relação ao gene de referência. Assim a eficiência da PCR em tempo real é compensada para corrigir as variações existentes entre amostras (uma a uma), integridade do RNA, eficiência da RT e carregamento do cDNA. Além disso, recomenda-se a determinação da eficiência da PCR em triplicatas da amostra composta para cada tecido. Essa amostra composta, representativa de todos os RNA do experimento (controle + tratamentos), tem como finalidade acumular todos os impactos das variações possíveis numa única curva de eficiência.

4.4.3 NormFinder x GeNorm: resultados

Como demonstra o resumo de expressão de genes na Tabela 13, o *GAPDH* e a *UbiQ2* foram os genes mais expressos ao longo de todos os tecidos de cana-de-açúcar avaliados pelo SUCEST porém, não são os mais estáveis segundo os dados das bibliotecas do genoma. Para avaliar o gene mais estável através do programa NormFinder, os cinco genes

selecionados (*Actina*, *GAPDH*, *Tubulina* e as duas *UbiQs*) combinados com os cinco grupos considerados (tecidos/órgãos) identificados por letras (meristema (M), inflorescência (I), folha (F), colmo (C) raiz cultivada com alto P (RP+) e com baixo P (RP-)). O menor valor de estabilidade expressão gênica (Sv) é o gene *UbiQ1* (Sv = 0,587), enquanto a melhor combinação é do *GAPDH/Tubulina* (Sv = 0,287) representando serem os genes mais estáveis de acordo com a primeira análise do NormFinder. Em análises subsequentes, eliminou-se sempre o gene menos estável, ou seja, com o maior valor Sv, até se obter apenas 3 genes na análise. O gene candidato *UbiQ1* confirmou ser o mais estável em todas as etapas, sendo na última seguido por *Actina* e *GAPDH*. As melhores combinações de dois genes foram *Tubulina/UbiQ1* (Sv = 0,473) e *Actina/GAPDH* (Sv = 0,401) quando se consideraram 4 candidatos (*UbiQ1*, *Actina*, *GAPDH* e *Tubulina*) e 3 candidatos (*UbiQ1*, *Actina* e *GAPDH*) respectivamente (Tabela 14). Independente da exclusão efetuada a cada nova rodada, a *UbiQ1* foi o candidato mais estável, apresentando o menor valor Sv evidenciando a robustez do programa NormFinder.

Em paralelo, também avaliou-se a estabilidade de expressão através do *GeNorm*. Esse aplicativo calcula o valor de estabilidade de expressão *M* de um gene como sendo a média das variações *V* do valor de expressão, dos possíveis pares formados por esse gene e os demais candidatos analisados. O algoritmo do programa exclui o maior valor *M* e depois realiza a avaliação das médias de variação de expressão restantes, e assim sucessivamente. Um maior detalhamento do princípio matemático do cálculo foi publicado por Vandesompele et al. (2002)^[138]. Dessa forma foi possível classificar os cinco genes candidatos quanto à estabilidade de expressão *M*. Ao comparar os resultados de estabilidade de expressão do *NormFinder* e *GeNorm* observou-se que diferentes genes foram classificados como mais estáveis dentre os cinco avaliados (*Actina*, *GAPDH*, *Tubulina* e as duas *UbiQs*). O *NormFinder* apresentou a *UbiQ1* como mais estável seguido pelo *GAPDH*, enquanto o *GeNorm* considerou a *Actina* e *GAPDH* como os mais estáveis seguido pela *UbiQ1* (Tabela 15). A Figura 9 dá uma idéia de como as diferentes abordagens dos dois modelos

produzem diferentes listas de classificação de genes quanto à estabilidade de expressão. O algoritmo *NormFinder* analisa a estabilidade de expressão de todos os candidatos para selecionar o melhor normalizador. Ao se remover o candidato menos estável, no caso a *UbiQ2* (Tabela 15), a variabilidade de expressão do grupo remanescente muda de forma a produzir um resultado alternativo para o segundo e terceiro lugares da classificação de estabilidade. Entretanto o gene mais estável, a *UbiQ1*, permaneceu no topo da lista, demonstrando a robustez do programa.

Essas análises preliminares indicam *Actina-UbiQ2* e *UbiQ2-Tubulina* como os menos estáveis pela as análises do *NormFinder* e *GeNorm*, respectivamente, indicando que estes *housekeeping genes* são instáveis considerando os cinco tecidos/órgãos aqui testados em cana-de-açúcar. No entanto, ao se focalizar nos grupos dois a dois, ou seja, nos tecidos/órgãos, é possível que *Actina* seja indicado como normalizador para estudo de expressão gênica em raízes cultivadas com alto ou baixo fósforo, enquanto a *UbiQ2* parece ser boa referência para estudos comparativos entre colmo e folha.

Para todas as amostras de cana avaliadas, os melhores genes de referência são *UbiQ1* e *Actina/GAPDH* obtidos pelo *NormFinder* e *GeNorm*, respectivamente. A análise da soma do desvio padrão de cada grupo (tecido/órgão) mostrou que o gene da *UbiQ1* (média = $\pm$ DP, 21,72 $\pm$ 0,86) é o mais estável seguido por *Tubulina* (média = $\pm$ DP, 18,86 $\pm$ 0,96), *GAPDH* (média = $\pm$ DP, 15,68 $\pm$ 1,09), *Actina* (média = $\pm$ DP, 18,33 $\pm$ 1,48), *UbiQ2* (média = $\pm$ DP, 14,42 $\pm$ 2,14). Apesar da *Tubulina* ser sutilmente mais estável, o *GAPDH* apresentou maior correlação de expressão com *Actina* e, portanto, como descrito anteriormente, o *GeNorm* tende a selecionar o melhor par pela sua similaridade, o que justamente aconteceu na análise do genes aqui avaliados. Apesar do fato que o *NormFinder* selecionou *GAPDH/Tubulina* como o melhor par considerando a variação de expressão apenas.

Tabela 15 Candidatos a genes de referência classificados de acordo com sua estabilidade de expressão gênica pelo programa *NormFinder*. Os algarismos indicam o número de genes restantes na análise a cada coluna após exclusão do menos estável. A última coluna mostra o resultado do *Genorm*.

NormFinder			Genorm
5	4	3	5 - 3
<i>UbiQ1</i> (0,587)	<i>UbiQ1</i> (0,454)	<i>UbiQ1</i> (0,437)	<i>Actina/ GAPDH</i>
<i>GAPDH</i> (0,663)	<i>Actina</i> (0,630)	<i>Actina</i> (0,541)	-
<i>Tubulina</i> (0,674)	<i>GAPDH</i> (0,692)	<i>GAPDH</i> (0,628)	<i>UbiQ1</i>
<i>Actina</i> (0,780)	<i>Tubulina</i> (0,711)		<i>UbiQ2</i>
<i>UbiQ2</i> (0,833)	-	-	<i>Tubulina</i>
<i>Best gene combination</i>			
<i>GAPDH/ Tubulina</i> (0,287)	<i>Tubulina/ UbiQ1</i> (0,473)	<i>Actina/ GAPDH</i> (0,401)	-

4.4.4 Validação do melhor candidato par todos os tecidos

Neste item será descrito o teste realizado para avaliar a confiabilidade da classificação dos candidatos à referência segundo os aplicativos *NormFinder* e *GeNorm*, ou seja, o gene ou par mais estável indicado por estas duas ferramentas. Dentre os cinco tecidos foram avaliadas as variações da expressão dos três melhor classificados: *UbiQ1*, *GAPDH* e *Actina*, e para os fatores de normalização (FN) gerados a partir dos melhores pares, sendo eles FN₁ (*Actina/GAPDH*) e FN₂ (*Tubulina/GAPDH*), após a normalização dos genes de interesse *MTI*, *MTII*, *MTIII*, *PT7* e *PT8*. Durante o processo de normalização entre diferentes grupos (células, tecidos, órgãos, etc.), o gene de referência (ou genes) devem possuir mínima variação de expressão para poder proceder a uma normalização apropriada. Para estudar essa variabilidade determinou-se a variação de expressão gene-específica como sendo a média do erro padrão de cada gene ou fator de normalização (FN) para cada grupo de tecido/órgão (meristema, inflorescência, colmo e raízes com alto e baixo fósforo)

após análise de expressão no aplicativo REST (Tabela 16). Nessa análise o valor de expressão é dado pela razão entre um gene e normalizador, considerando um tecido como controle. Dessa forma, o valor de expressão (ou razão de expressão) para um normalizador é um (1), no caso aqui se considerou a folha como órgão controle com relação aos demais tecidos/órgãos. Nesse estudo também se aplicaram dados da eficiência da reação normalizados, isto é, incluíram-se nos cálculos de expressão gênica o valor de expressão do gene de referência para compensação das variações inter-PCR, entre diferentes rodadas da PCR. Pode ser observado que a *UbiQ1* é o gene mais estável com o menor valor médio do erro padrão da média ($S = \pm 0,203$) seguido pelo *Tubulina/GAPDH* (FN₂) ($S = \pm 0,285$), *Actina* ($S = \pm 0,330$), *GAPDH* ($S = \pm 0,361$) e por fim *Actina/GAPDH* (FN₁) ($S = \pm 0,389$) (Tabela 16). Essas observações, comparadas aos resultados dos programas, demonstram que o *NormFinder* avalia variações de expressão intra e intergrupos, enquanto o algoritmo *GeNorm* tende a selecionar a o par de genes com maior similaridade.

Tabela 16 Variabilidade da expressão dos genes candidatos obtida de dados normalizados de expressão para a determinação do número ótimo de genes controle Valores do erro padrão (S) da média de expressão obtidos após análise de expressão dos genes *MT I* *MT II* *MT III* *PT7* e *PT8* (REST 2005 Corbett Reaserch Australia) As médias representam a variabilidade de expressão intragrupo (genes alvo testados). Os fatores de normalização testados foram *Actin/GAPDH* (FN₁) e *Tubulin/GAPDH* (FN₂)

Grupo	Normalizadores (S)				
	<i>Actina</i>	<i>UbiQ1</i>	<i>GAPDH</i>	FN ₁	FN ₂
Meristema	0,332	0,100	0,336	0,374	0,219
Inflorescência	0,484	0,113	0,364	0,529	0,332
Colmo	0,221	0,196	0,354	0,326	0,190
Raiz P+	0,306	0,186	0,386	0,379	0,321
Raiz P-	0,308	0,418	0,366	0,337	0,363
Média	0,330	0,203	0,361	0,389	0,285

Em seguida foram comparados os perfis de expressão de cada normalizador utilizado para um determinado tecido ou órgão. No conjunto, os perfis de expressão entre os grupos Raiz com alto Pi e baixo Pi foram similares para normalizadores diferentes (*Actina*, *UbiQ1*,

GAPDH). Os genes detectados como induzidos ou reprimidos mantiveram essa tendência da expressão independente do normalizador utilizado. Em alguns casos, a validação da expressão dos genes de interesse confirmou-se ou não, apresentando-se significativa ou não para um certo tecido ou órgão, dependendo do gene referência ou fator de normalizador empregado (Figura 11). A maior discordância encontrada foi o grupo da inflorescência, ao utilizar os normalizadores *Actina* e *UbiQ1* produzindo diferentes perfis de expressão gênica. Esse resultado revela considerável variação de expressão dos candidatos na inflorescência e que novos genes devem ser mais bem testado quando se desejar comparar a expressão gênica entre folha e inflorescência. As raízes com alto Pi apresentaram a indução de *MTII* sem a detecção significativa de *MTI*, os outros genes alvos são detectados como expressos nas folha quando *UbiQ1* foi o gene de referência. Por outro lado os demais normalizadores testados revelaram a detecção de *MTI* e *MTII*, e repressão dos genes *MTIII*, *PT7* e *PT8* nas raízes com alto P. O gene da *UbiQ1* é diferencialmente expresso entre raiz com alto P e folha, e portanto, não parece um bom candidato para avaliar o perfil de expressão entre esses dois órgãos. Por outro, lado a variação da *UbiQ1* entre os dois tratamentos de Pi na raiz é mínima, revelando-o como bom candidato. No colmo, apenas o *GAPDH* possibilitou a detecção de expressão da *MTII* em comparação aos demais normalizadores, embora os demais genes alvos tenham mantido a mesma tendência de expressão gerada por todos os normalizadores testados. Ao se comparar os dados de expressão normalizados observou-se uma correlação positiva do perfil de expressão dos genes alvo gerados pelos genes de referência *Actina* e *UbiQ1* ($R^2 = 0,97885$), *Actina* e *Actina/GAPDH* (FN_1 , $R^2 = 0,95849$), e entre *UbiQ1* e *Actina/GAPDH* ($R^2 = 0,90864$). O gene da *Actina* é preferencialmente expresso no meristema, inflorescência e colmo do que na folha, a sua utilização como gene de referência implica em expressar os genes analisados preferencialmente na folha par estes tecidos. Ao usar o FN_1 esse efeito tendencioso é atenuado no meristema, inflorescência e colmo. No entanto, mantém a expressão dos genes alvo superestimada na folha e subestimada na raiz com alto Pi, ou ao contrário, subestimada na folha e superestimada na

raiz com baixo Pi quando utilizado como normalizador da expressão gênica dos tratamentos de +Pi e -Pi nas raízes, respectivamente, com relação à folha.

Tomando todos esses resultados em consideração, fica demonstrado que *UbiQ1* foi realmente o gene mais estável dentre os avaliados e pode ser utilizado como referência para quantificação relativa de expressão gênica dos genes alvos aqui testados, para os respectivos tecidos e órgão de cana-de-açúcar. Entretanto, deve-se manter em mente qual o tipo de experimento, tratamentos e a hipótese biológica a serem testados. De forma complementar estes resultados mostram que o aplicativo REST é ferramenta robusta na análise de expressão de genes com validação estatística. O programa calcula a razão de expressão entre genes de interesse e o normalizador (podendo ser um gene ou mais) e testa o resultado de expressão quanto a sua significância ^[140, 141].

4.4.5 Normalizador gene-múltiplo: um é bom, dois pode ser....

Nos casos em que um ótimo gene de normalização não é encontrado, pode ser interessante a utilização de um fator de normalização (FN) que considera a normalização por múltiplos genes. A utilização de um FN gerado a partir da seleção de um conjunto de candidatos pode incrementar a normalização, caso a variação de expressão dos selecionados for menor que a variação encontrada individualmente nos genes testados ^[137, 139]. O uso de FN baseados em múltiplos genes, deve ser testado a cada novo experimento, o que pode não ser peculiarmente prático quando as quantidades de RNA disponível são limitantes ou quando poucos genes alvo estão sob investigação. Portanto o número de genes selecionados para compor um FN tem de ser uma ponderação entre a praticidade metodológica e a precisão desejada na normalização.

Em geral, os fatores a serem observados para se obter uma boa normalização devem ser mais bem estudados quando existe significativa variabilidade de expressão intra e intergrupos. Variações essas, denominadas intragrupos quando encontradas entre genes candidatos a normalizadores dentro de um grupo, e designadas intergrupos quando a

variabilidade de um ou mais genes encontra-se entre os “grupos”, os quais podem ser: tratamentos vs controle; genótipos; cinética de expressão no tempo; estádios de desenvolvimento; indexado (inoculado) ou não; doentes e sadios; e outros. Os resultados apresentados na Figura 9 mostram grande variação de expressão intergrupos entre os genes candidatos à referência, principalmente quando se compara a raiz com baixo P e o colmo em relação à folha (“órgão de referência”), fica caracterizado neste caso que novos genes devem ser testados. Essa ausência de estabilidade é típica e envolve variações de expressão gênica intra e intergrupos. Em caso de candidatos a gene de referência não ser bem selecionado o FN não eliminará a variação de expressão intergrupos, podendo sim intensificá-la. Através dos métodos utilizados, os pares *Actina/Tubulina* ou *GAPDH/UbiQ2* foram identificados como as melhores combinações de candidatos para análises entre meristemas e folha (Figura 9). Logo, se o par *Actina/Tubulina* for escolhido para gerar um FN, os genes alvo detectados no meristema e folha estarão sendo subestimando ou superestimados, respectivamente. A escolha desse fator de normalização não traz nenhuma vantagem em relação a adoção da *UbiQ1* como gene de referência, uma vez que a variação de expressão do par citado é transferida para o fator de normalização. Por outro lado, ao escolher *GAPDH/UbiQ2* para obter um FN, a expressão diferencial de genes alvo será subestimada na folha, e superestimada no meristema. O melhor par normalizador para o colmo é *GAPDH/UbiQ1*, segundo o programa *GeNorm*, mas causará uma estimativa errônea da expressão gênica em estudos entre folha e colmo. Deste modo, mesmo que a amplitude da variação de expressão dos FNs citados seja reduzida, a utilização dos mesmos poderá acarretar equívocos no perfil de expressão de genes alvo entre os grupos citados, folha e colmo. O método do *NormFinder* sugere o par *UbiQ1/UbiQ2* como sendo o mais estável para estudos de expressão entre folha/inflorescência. Nestes caso o FN gerado poderá incrementar a precisão das análises de expressão gênica, pois os genes, *UbiQ1* e *UbiQ2*, possuem uma variabilidade de expressão similar em direções opostas. De maneira similar ao

fator de normalização *Tubulina/UbiQ1*, designado pelo *NormFinder* para colmo vs Folha (Figura 9).

4.4.6 Variabilidade de expressão gênica

Dando continuidade ao teste de genes de referência, realizou-se a análise de variação da expressão intergrupos, obtendo-se comparações dois a dois, ou seja, comparando a variabilidade de expressão encontradas no meristema, inflorescência, colmo, e raízes em relação à folha (escolhido arbitrariamente como um padrão). As diferenças da variabilidade de expressão gênica estão representadas graficamente na Figura 9. Os valores positivos representam a variabilidade de expressão a favor de tecidos ou órgãos, enquanto valores negativos correspondem à variabilidade a favor da folha (Figura 9). Os resultados da variabilidade de expressão entre grupos, em comparações aos pares, revelam a *UbiQ1* como gene mais estável com menor oscilação em relação à abscissa.

Ao comparar a variabilidade de expressão entre raízes com alto Pi e folha via *NormFinder*, a *Tubulina* foi o melhor gene com a menor variação da expressão e com o menor desvio padrão (SD) dentre as amostras de raízes com alto Pi ($SD = 1.20 \times 10^{-3}$) e na folha ($SD = 4.04 \times 10^{-4}$, Tabela 17) e com a menor variação intragrupos (+ 0.003, dados Figura 9), comparável à da *Actina* que não teve quase nenhuma variabilidade entre raízes com alto Pi e a folha (Figura 9). Em seguida, na comparação entre a raízes com baixo Pi e a folha, *NormFinder* apresenta como o melhor gene a *Actina* e o melhor par *UbiQ1/Tubulina* ambos com menor variação da expressão de amostras na folha, com o SD o mais baixo ($\cong 10^{-4}$) (Tabela 17). Ao considerar o colmo versus a folha, *NormFinder* indica *UbiQ2* como melhor gene único e o melhor par a *UbiQ1/Tubulina* pois tem menor variação da expressão entre amostras dentro dos grupos, com SD menores do que os da *UbiQ2* (Tabela 17). No meristema o desvio padrão é do gene *UbiQ1* ($SD = 7,5 \times 10^{-3}$) correspondente ao menor valor encontrado para o mesmo gene na folha, em concordância com o mais estável indicado pelo *NormFinder*.

Apenas considerando a folha individualmente, a *UbiQ1* teve o menor desvio padrão ($5,77 \times 10^{-4}$) em relação aos demais candidatos. Este demonstra ser o gene mais estável, corroborando com: os resultados do *NormFinder*, da análise dos desvios em relação à média das amostras triplicatas, e da variabilidade de expressão (Figura 9).

4.4.7 Simulação do uso de HKG como normalizadores

Imagine dois genes de interesse "A" e "B" com valores logarítmicos da expressão, opostos, de -0.5 e 0.5 (linhas tracejadas na Figura 9) entre dois grupos a comparar: tecidos ou órgãos versus folha. Esses genes possuem uma diferença total da expressão equivalente a 1,0, preferencialmente expressos em diferentes tecidos/órgãos. Caso utilizemos os genes candidatos selecionados pelo *NormFinder* para a normalização da expressão na inflorescência, colmo e tratamentos de raízes com relação à folha, ou seja, selecionar *UbiQ1*^Δ, *UbiQ1*^Δ, *UbiQ2*^K, *Tubulina*^{*} e *Actina*^Δ respectivamente (Figura 9), para estudar a expressão gênica de "A" e "B", os resultados indicaram que ambos, "A" e "B", estarão expressos com a variação total com cerca de 1,0, em direções opostas. Todavia, a expressão de "B" detectada em inflorescência, colmo, e raízes estará sutilmente superestimada, enquanto a expressão de "A" estará sendo subestimada na folha. No meristema o melhor candidato a referência é o gene *UbiQ1*. A sua utilização como normalizador implicaria na subestimação da expressão de "B" no meristema e a superestimação da expressão de "A" na folha.

De forma análoga, ao se utilizar o gene *GAPDH* como normalizador, com base na indicação do *GeNorm* para o meristema, colmo e raiz com -P, um gene diferencialmente expresso nesses tecidos estaria erroneamente superestimado, enquanto o gene "A", cuja expressão é -0,5 na base log, possivelmente não seria significativamente detectado na folha. Um resultado similar porém, oposto, será observado ao utilizar o melhor par de genes normalizadores, *GAPDH*^Δ/*UbiQ2*^K (Figura 9) segundo o *GeNorm*, para analisar a expressão gênica entre raiz com alto Pi e folha. Nesse caso, será superestimada a expressão do gene

“**A**” que é diferencialmente expresso na folha, e “**B**” possivelmente não significativamente detectado, o qual é expresso nas raízes. Fica claro então, o *NormFinder* busca selecionar o par de genes com a mínima variação intra e intergrupos, ao passo que o *GeNorm* tende a selecionar o par de genes com maior similaridade com base na comparação aos pares dos candidatos.

A análise acima mencionada, de forma preliminar, indica que os melhores normalizadores para os tecidos/órgãos de cana-de-açúcar aqui estudados, são: *UbiQ1* para o meristema; *UbiQ1/UbiQ2* para a inflorescência; *UbiQ2* para o colmo; *Tubulina* para raízes com mais +Pi; *Actina* para raízes com baixo Pi; e *Actina* para os dois tratamentos com Pi da raiz, comparando todos os tecidos/órgãos com relação à folha. Para o colmo e a inflorescência os melhores pares de genes normalizadores são *UbiQ1/Tubulina* e *UbiQ1/UbiQ2*, respectivamente. Ainda assim, para certos tecidos, como o próprio colmo, e as raízes, sugere-se mais investigações com maior número de candidatos de baixa variabilidade de expressão entre grupos. Ao se observar a Figura 9 verifica-se ampla dispersão dos genes testados entre estes tecidos e a folha. Contudo, esses genes candidatos não devem ser cegamente adotados sem se considerar os genes alvo a serem investigados, as vias metabólicas (funções) em que os genes (alvo e de interesse) estão envolvidos e ou se estão inter-relacionados, correções. Melhor dizendo, a questão biológica que se deseja esclarecer.

Tabela 17 Dados brutos de valor de expressão utilizados para comparação da variabilidade de expressão nos tecidos ou órgãos de cana-de-açúcar em relação à folha

tecido/órgão	<i>samples</i>	Genes				
		<i>Actina</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Tubulina</i>	<i>UbiQ1</i>	<i>UbiQ2</i>
folha	a	0,007	0,030	0,011	0,015	0,039
	b	0,010	0,021	0,010	0,015	0,030
	c	0,007	0,038	0,011	0,014	0,040
	<i>Média</i>	0,008	0,030	0,011	0,015	0,036
	<i>SD</i>	173 x 10 ⁻³	850 x 10 ⁻³	404 x 10 ⁻⁴	577 x 10 ⁻⁴	551 x 10 ⁻³
Meristema	<i>samples</i>					
	a	0,117	0,094	0,083	0,083	0,102
	b	0,083	0,076	0,081	0,098	0,086
	c	0,074	0,088	0,096	0,091	0,094
	<i>Média</i>	0,091	0,086	0,087	0,091	0,094
Inflorescência	<i>SD</i>	227 x 10 ⁻²	917x 10 ⁻³	826 x 10 ⁻³	750 x 10 ⁻³	800 x 10 ⁻³
	<i>samples</i>					
	a	0,016	0,020	0,006	0,010	0,095
	b	0,031	0,014	0,004	0,012	0,029
	c	0,033	0,016	0,004	0,012	0,023
Colmo	<i>Média</i>	0,027	0,017	0,004	0,011	0,049
	<i>SD</i>	929 x 10 ⁻³	306 x 10 ⁻³	961 x 10 ⁻⁴	115 x 10 ⁻³	399 x 10 ⁻²
	<i>samples</i>					
	a	0,129	0,033	0,089	0,030	0,154
	b	0,107	0,035	0,097	0,032	0,120
Raiz P+	c	0,118	0,041	0,104	0,023	0,113
	<i>Média</i>	0,118	0,036	0,097	0,028	0,129
	<i>SD</i>	110 x 10 ⁻²	416 x 10 ⁻³	750 x 10 ⁻³	473 x 10 ⁻³	219 x 10 ⁻²
	<i>samples</i>					
	a	0,010	0,053	0,009	0,004	0,101
Raiz P-	b	0,007	0,051	0,010	0,005	0,107
	c	0,010	0,048	0,008	0,005	0,073
	<i>Média</i>	0,009	0,051	0,009	0,005	0,094
	<i>SD</i>	173 x 10 ⁻³	252 x 10 ⁻³	120 x 10 ⁻³	577 x 10 ⁻⁴	181 x 10 ⁻²
Raiz P-	<i>samples</i>					
	a	0,001	0,001	0,007	0,001	0,020
	b	0,001	0,001	0,006	0,001	0,046
	c	0,001	0,001	0,009	0,001	0,044
	<i>Média</i>	0,001	0,001	0,007	0,001	0,037
Raiz P-	<i>SD</i>	nd	nd	110 x 10 ⁻³	nd	145 x 10 ⁻³

Tecido ou órgão	Diferença de expressão intergrupos					Melhor par de genes de referência	
	Folha						
	<i>Actina</i>	<i>GAPDH</i>	<i>Tubulina</i>	<i>UbiQ1</i>	<i>UbiQ2</i>	<i>NormFinder</i>	<i>Genorm</i>
	0,376	-0,294	0,208	0,070*	-0,360		
M	(± 0,020)	(± 0,046)	(± 0,007)	(± 0,014)	(± 0,004)	<i>Actina/UbiQ2</i>	<i>GAPDH/UbiQ2</i>
	0628	-0,236	-0,399	-0,087*	0,094		
In	(± 0,150)	(± 0,043)	(± 0,003)	(± 0,012)	(± 0,303)	<i>UbiQ1/UbiQ2</i>	<i>GAPDH/UbiQ1</i>
	0,647	-0,591	0,396	-0,380	-0,072*		
Colmo	(± 0,046)	(± 0,033)	(± 0,006)	(± 0,018)	(± 0,007)	<i>Tubulina/UbiQ1</i>	<i>GAPDH/UbiQ1</i>
	0,032	0,254	-0,125*	-0,603	0,443		
Raiz P+	(± 0,008)	(± 0,044)	(± 0,003)	(± 0,015)	(± 0,014)	<i>GAPDH/Tubulina</i>	<i>GAPDH/UbiQ2</i>
	-0,180*	-0,828	0,671	-0,490	0,828		
Raiz P-	(± 0,045)	(± 0,043)	(± 0,011)	(± 0,002)	(± 0,106)	<i>Tubulina/UbiQ1</i>	<i>GAPDH/Actina</i>
* gene mais estável para cada órgão e ou tecido segundo resultados do <i>NormFinder</i>							

* gene mais estável para cada órgão e ou tecido segundo resultados do *NormFinder*

Figura 9 Representação gráfica da variabilidade de expressão intergrupos (tecido/órgão vs folha) dos genes candidatos *Actina* (Δ) *GAPDH* ($\square$) *Tubulina* ($\bullet$) *UbiQ1* ($\diamond$) e *UbiQ2* ($\times$) ranqueados segundo o *NormFinder* (melhor gene – setas pretas; melhor par – retângulos tracejados) e *GeNorm* (melhor par – círculos tracejados) A linha horizontal grossa tracejada representa a variação média da expressão igual a zero enquanto os valores positivos a expressão preferencial no meristema (M) inflorescência (I) colmo (C) raiz + alto Pi (RP+) ou raiz + baixo Pi (RP-) e os negativos a expressão na folha Tabela: valores da variabilidade de expressão gênica plotados na Figura. Os valores do intervalo de confiança da variabilidade de expressão estão indicados entre parênteses À direita as duas últimas colunas apresentam o melhor par de candidatos para cada tecido/órgão indicados pelos aplicativos *NormFinder* e *Genorm*

A validação dessa abordagem para seleção de genes de referência está correlacionada com o número de amostras e genes candidatos ^[139]. O conjunto de genes candidatos escolhido para a avaliação deve pertencer a uma pré-seleção de candidatos da qual se espera pouca variabilidade de expressão gênica entre os grupos. Nesse estudo, foram selecionados os *housekeeping genes*, classicamente usados como normalizadores, cujo perfil de expressão foi traçado a partir do banco de dados EST do SUCEST (Tabela 13). Conclui-se que estes cinco HKG são diferencialmente expressos nos tecidos e órgãos de cana testados.

4.4.8 Consistência das análises de variabilidade na seleção de genes de referência

Para avaliar a robustez da classificação dos melhores candidatos em relação à correlação de estabilidade de expressão entre os genes testados, comparou-se os resultados obtidos com cinco (5) e quatro (4) genes, excluindo-se os mais instáveis, *UbiQ2* e *Tubulina*, segundo os dois aplicativos *NormFinder* e *GeNorm*, respectivamente (Tabela 15). Primeiro, realizou-se a análise sem a *Tubulina* utilizando os dois aplicativos *NormFinder* e *GeNorm* (Figura 10A). Os resultados do *GeNorm* são inconsistentes pois mostram grande contraste na correlação da variabilidade de expressão entre os genes, e uma tendência oposta entre os genes *UbiQ1* versus *GAPDH* e *UbiQ2* versus *Actina*, quando a *Tubulina* é removida da análise (linhas vermelhas da Figura 10A). A exclusão da *Tubulina* implica na seleção de *GAPDH/UbiQ2* como a melhor combinação, os quais são similares, possuindo uma correlação na variabilidade de expressão no meristema, inflorescência, colmo e raiz com +Pi (Figura 9). Em segundo, uma nova análise nos dois programas foi realizada sem se incluir a *UbiQ2* (Figura 10B). O programa *GeNorm* mantém uma tendência comum a todos os genes analisados porém, a correlação da variabilidade de expressão mostrou valores altos em particular para *UbiQ1*, *GAPDH*, e *Actina* (Figura 10B). esse resultado enfatiza a inclinação do algoritmo *GeNorm* em classificar genes correlacionados ao invés de classificar os genes candidatos com a mínima variabilidade de expressão. A Figura 10 mostra como a abordagem

do *NormFinder* é minimamente influenciada pela exclusão da *Tubulina* e *UbiQ2*, mantendo a mesma correlação da variabilidade entre os genes candidatos. Em acréscimo, o *GeNorm* sugere dois normalizadores totalmente diferentes, *GAPDH/UbiQ2* e *Actina/UbiQ1* ao se excluir *Tubulina* e *UbiQ2*, respectivamente. Enquanto o *NormFinder* mantém o gene *UbiQ1* como sendo o candidato mais estável independentemente da exclusão de um gene, e incluindo-os ao indicar os melhores pares *Tubulina/UbiQ1* e *UbiQ2/UbiQ1* quando a *UbiQ2* e *Tubulina* são omitidos das análises, respectivamente.

4.4.9 Validação da expressão gênica em cada tecido

Neste item, realizou-se uma série de análises comparativas para verificar o efeito na expressão de genes de interesse e sua validação estatística em tecidos e ou órgãos, testando normalizadores com expressão diferencial em colmo e folha. Os normalizadores escolhidos foram *GAPDH*, *Tubulina*, *UbiQ2* e o par *Tubulina/UbiQ1*, os melhores candidatos até aqui para estudos entre folha e colmo. Quatro estimativas da expressão gênica foram realizadas considerando *Tubulina*, *Actina*, *UbiQ2* e *GAPDH*, além da metalotioneína *MTII* como genes de interesse combinando com um normalizador de cada vez. O primeiro gene testado como referência foi o *GAPDH*, que possui expressão constitutiva folhas ^[177, 178]. Observou-se que todos os genes de interesse testados tiveram sua expressão sobreestimada em pelo menos uma vez (Tabela 18). E mais, esse resultado validou com significância estatística *Tubulina*, *Actina* e *MTII* como diferencialmente expressos no colmo, e a *UbiQ2* sem expressão diferencial entre colmo e folha. Ao utilizar a *Tubulina* como referência, a expressão dos genes de interesse foi subestimada apresentando-se três ou quatro vezes reprimidos em relação aos resultados de expressão observados quando a *UbiQ2* ou *GAPDH* são considerados genes de referência, respectivamente. Contudo, essa expressão detectada não foi significativa em relação à folha, tida como um “controle”. Além disso, o gene mais estável como referência, a *UbiQ2*, apresentou valores de expressão dos genes alvos similares aos observados ao se utilizar o FN do par *Tubulina/UbiQ1*, esses

resultados são consistentes. A forte correlação linear entre esses dados de expressão ($R^2 > 0,9999$) demonstra que, nesse caso, não há incremento na análise de expressão de genes de interesse quando se utiliza um gene ou o melhor par como referência.

Figura 10. Robustez da classificação dos genes candidatos em relação a correlação da expressão entre os mesmos Comparação da correlação de expressão utilizando todos os candidatos (linhas sólidas) e excluindo os piores classificados (linhas pontilhadas) *Tubulina* (A) e *UbiQ2* (B) na análise feita no *NormFinder* e *GeNorm* respectivamente As linhas azuis representam a variabilidade de expressão do *NormFinder* enquanto as linhas vermelhas representam a média da variabilidade aos pares de cada gene segundo o *GeNorm* Valores menores representam os genes mais estáveis

Figura 11. Expressão relativa dos genes *MTI* (I) *MTII* (II) *MTIII* (III) *PT7* (7) e *PT8* (8) nos diferentes tecidos ou órgãos em relação a folha. Os valores da expressão correspondem à razão entre gene de interesse e gene de referência: *Actina* *UbiQ1* *GAPDH* *FN1* (*Actina*/*GAPDH*) e *FN2* (*Tubulina*/*GAPDH*). Os valores positivos e negativos indicam o número de vezes que um gene é expresso nos tecidos/órgãos ou folha respectivamente. As colunas em cinza indicam a validação estatística da expressão (Pfaffl et al 2001; Pfaffl et al 2002; Corbett Research Austrália) e as barras indicam o erro padrão das triplicatas de cada amostra.

Tabela 18 Análise de expressão relativa considerando os genes de referência (1º coluna) em relação aos genes de interesse (*Target*) comparando-se o colmo contra a folha com auxílio do programa REST [REST 2005 Corbett Research Austrália; Pfaffl et al 2002] Os valores estão representando o número de vezes que um gene é expresso em relação ao de referência.

Gene de Referência	<i>Target</i>				
	<i>Tubulina</i>	<i>Actina</i>	<i>UbiQ2</i>	<i>MT II</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GAPDH</i>	61 ($\pm$ 12)*	50 ($\pm$ 17)*	20 ($\pm$ 08)	155 ($\pm$ 61)*	1 ($\pm$ 05)
<i>Tubulina</i>	1 ($\pm$ 02)	08 ($\pm$ 03)	03 ($\pm$ 01)	25 ($\pm$ 10)	02 ($\pm$ 00)
<i>UbiQ2</i>	30 ($\pm$ 06)	25 ($\pm$ 08)	1 ($\pm$ 04)	77 ($\pm$ 30)	05 ($\pm$ 03)
<i>Tub/UbiQ1</i>	22 ($\pm$ 04)	18 ($\pm$ 06)	07 ($\pm$ 03)	54 ($\pm$ 21)	04 ($\pm$ 02)

* *P*-value < 005 diferença significativa da expressão gênica entre colmo e folha levando em consideração a eficiência da reação e a normalização por um gene de referência.

Com certeza não existe um gene de referência para a quantificação que contemple todos as condições experimentais. Em termos gerais, é aceitável se testar um conjunto de genes candidatos, com baixa variabilidade de expressão, e até se usar dois ou três genes de referência ^[138]. Todavia, é uma boa estratégia ter em mãos uma pequena lista de candidatos potenciais testados, para diferentes tecidos ou órgãos sempre que se desejar estabelecer um novo delineamento experimental. Logo, foram examinados aqui o perfil de expressão gênica de cinco *housekeeping genes* clássicos para um conjunto de tecidos e órgãos de cana-de-açúcar.

Para avaliar a estabilidade de expressão e selecionar o melhor gene normalizador foram utilizados os aplicativos gratuitos *GeNorm* e *NormFinder*. Para investigar a validação da expressão gênica comparando-se os grupos dois a dois utilizou-se a ferramenta REST, que possibilita a determinar a razão da expressão gênica para cada tecido individualmente, normalizada ou não, dependendo da escolha dos dados de saída do programa.

É no mínimo curioso como a *UbiQ1*, que é pouco expressa nas bibliotecas EST, confirmou seu baixo nível de expressão para todos os tecidos testados, especialmente em colmo e raízes. E confirmou-se como melhor candidato a gene de referência seguindo os critérios do *NormFinder* para os cinco tecidos de cana-de-açúcar avaliados. Esse resultado

também pressupõe que novos candidatos devem ser testados cuidadosamente ao se considerar um novo delineamento experimental, os tecidos considerados, número de amostras e principalmente a hipótese ou pergunta biológica que se deseja averiguar.

4.4.10 Estudo de transportadores de fosfato de cana-de-açúcar

Baseado nas seqüências de treze transportadores de fosfato de arroz ^[79] buscou-se identificar os seus ortólogos em cana-de-açúcar. Inicialmente, se obteve as seqüências codantes de 13 transportadores de arroz no GenBank^[79]. Depois foi realizada a busca no sítio *The Institute for Genomic Research* (www.tigr.org) para os treze genes de arroz, das seqüências transcritas completas (Tentative Cluster –TC) contendo as regiões UTR 5´ e 3´. Nos TCs encontrados, foram localizadas as regiões UTR 5´ e 3´, os iniciadores e sondas usadas no estudo desses transportadores de fosfato de arroz do tipo Pht1. A estrutura do gene revela a predominância de polimorfismos nas regiões 5´ e 3´ não traduzidas, e na alça hidrofílica que separa os 12 domínios transmembranares ^[12, 79]. A maioria das seqüências de cana do SUCEST são do tipo 5´, e associado ao fato desses genes PT serem muito conservados intra e interespecies, com similaridades entre membros da mesma espécie chegando a ser acima de 98 % ^[12], dificultam a identificação e segregação de PT e cana com base apenas nas análises em bancos de dados. Um estudo anterior desses transportadores de fosfato (PT) sugere a existência de pelo menos 10 membros ou isoformas do tipo Pht1 em cana-de-açúcar ^[78]. Concluiu-se então que seria uma boa estratégia para caracterização e estudos de expressão dessa família multigênica, desenhar iniciadores nas regiões UTR 3´ e ou 5´ dos genes de cana encontrados. Verificou-se que nas regiões UTR existem polimorfismos nas seqüências interessantes para o desenho de iniciadores (Figura 12). Dos treze genes TP de arroz (*Pht1;1–Pht1;13*) foram encontrados 4 TCs ortólogos em cana-de-açúcar, possuindo seqüências parciais de genes. Os ortólogos aos genes *ORYsa;Pht1;6*, *ORYsa;Pht1;7*, *ORYsa;Pht1;8* e *ORYsa;Pht1;12* foram identificados como TC278, TC61525, TC164 e TC7 em cana-de-açúcar, respectivamente. O TC7 corresponde a uma seqüência

parcial curta e não foi possível a sua utilização neste estudo. Os resumos das informações destes TC estão na Tabela 19.

Tabela 19. Resumo da anotação dos TP de Arroz encontrados no TIGR e os ortólogos de cana-de-açúcar

<i>Gene</i>	GB (n° acesso)	Seq. Codante	TC-arroz	<i>reads</i>	Chr. arroz	5´	3´	TC-cana
OsPT1	AF536961.1	1584	TC231832	36	3	2789365	2791328	-
OsPT2	AF536962.1	1587	TC231834	13	3	2797226	2799154	-
OsPT3	AF536963.1	1581	TC231836	4	10	15527132	15528712	-
OsPT4	AF536964.1	1617	TC231835	12	4	5664215	5667202	-
OsPT5	AF536965.1	1638	TC231838	2	4	5629364	5631731	-
OsPT6	AF536966.1	1605	TC239257	6	8	28079708	28081534	TC 278
OsPT7	AF536967.1	1581	TC242615	3	3	1991437	1993981	TC61525
OsPT8	AF536968.1	1626	TC231833	19	10	15534676	15537506	TC 164
OsPT9	AF536969.1	1749	Sing. NP657148	1	6	12523305	12523729	-
OsPT10	AF536970.1	1650	Sing. NP657149	1	6	12534235	12536779	-
OsPT11	AF536971.1	1668	TC223323	5	1	26503445	26505450	-
OsPT12	AF536972.1	1626	TC241839	3	3	2785928	2787728	TC 7
OsPT13	AF536973.1	1464	Sing. NP657152	1	4	5683106	5686108	-
RubQ1	U37687.1	1374	TC249093	110+				
RubQ2	AF184280.1	1374	TC261326	713+				

Nas análises de expressão gênica e de *Southern* foi incluída uma peroxidase (Perox) diferencialmente expressa em raízes micorrízicas, amplificada e clonada a partir de cDNA de raízes de cana-de-açúcar ^[98]. A sequência deste clone mostrou 90% e 91% de identidade com a peroxidase de milho (NCBI) e cana-de-açúcar (TIGR), respectivamente. Para a construção dos iniciadores foi utilizado o TC50215 ^[98].

Amostras de raízes de cana-de-açúcar foram coletadas aos 58 dpi com fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e tiveram seu RNA extraído como exemplificado na Figura 13. As raízes foram tratadas com BP ou AP e sendo inoculadas (Gc) ou não (ni) com o fungo, constituindo quatro tratamentos (BPni, BPGc, APni e APGc). Para cada tratamento foi extraído o RNA de três plantas, os quais foram quantificados por espectrofotometria, e fracionados em eletroforese para comparação das quantidades aplicadas e normalização das amostras (Figura 13). Através da visualização das amostras de RNA foram definidos três conjuntos com uma planta por tratamento, denominados de *Pool* 1, 2 e 3, conforme a tabela da Figura 13. Destes três conjuntos foram selecionados 2 para realização dos experimentos de qPCR, com amostras em triplicatas de cada tratamento por experimento, para os genes de interesse *PT7*, *PT8* e *Perox* do gene de referência *UbiQ1*. A validação da expressão dos

genes foi feita em uma única análise, juntando os dados do dois experimentos de qPCR, utilizando o programa REST.

Figura 12. Alinhamento múltiplo de seqüências gênicas de transportadores de fosfato PT6, PT7, PT8 (TC278, TC61525 e TC164, cana-de-açúcar); *ORYsa:PHT1;6*, *ORYsa:PHT1;7*, *ORYsa:PHT1;8* e *ORYsa:PHT1;12* (OsPT6, OsPT7, OsPT8 e OsPT12, de arroz) ^[79]; e *ZmPht1;1*, *ZmPht1;2* e *ZmPht1;4* (milho) ^[185]. A região reconhecida por cada iniciador está indicada na seqüência de genes de cana-de-açúcar (**negrito sublinhado**), sendo o sense (>>>) e o antisense (<<<). O códon inicial do quadro aberto de leitura (ORF) está indicado por retângulos.

OsPT6	1	-----
OsPT7	1	-----
OsPT8	1	-----
OsPT12	1	-----
ZmPht1;1	1	CAACAAGCTAGGCAGCTGCAAGCATCTCCCAAATCCCAGCCTGCTGCCCCGCGCGCAACACACTTCTCTGTGCGTTGCATTGCAGGGCAGC
ZmPht1;2	1	-----GAAGAACACCCCTTCTCTGGTCGTCGCA-----
ZmPht1;4	1	-----GCATCAAGCTAGGCAGGCCTGGTCCCGAAGAACACCCCTTCTCTGGTCGTCGCATCGCAGGGCAGC
		>>
PT6 (TC278)	1	-----CCCACGCGTCCGCAGCCAAGCATTCAAGCCGCCGCCATCGCC
PT7 (TC61525)	1	-----
PT8 (TC164)	1	-----

[illegible][illegible]

OsPT6	166	CGCATCTACTACCGCGTCAACGGGTCCTCCCGGTAACGCTCCGCGGCAAGTCTCCGCTTCGTCAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
OsPT7	151	CGCGTCTACTACACCCGCCACGGCGCGTCTCAACCGGGGAGCTTCGCCGCCCAACGCTCTCGCGGGCGTGAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
OsPT8	163	CGCATCTACTACACCCAGACTCCGCCAAGGCAACCCCGGCGAGCTTCGCCGCCCAACGTCGCCCGCGCGGTCAACGGAGTGGCGTTCGTGGGC
OsPT12	157	CGCATCTACTACACCCAGCTCCGCCAAGGCAACCCCGGCGTCTGCCGCCCAACATGCGCGCGCGGTGAATGGCGTCCGCGTTCGTGGGC
ZmPht1;1	268	CGCATCTACTACACGGACACCGACAGGGAACCCCGGCGTCTTCGCCGCCAACGTCGCCCGCGGGGTCAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
ZmPht1;2	202	CGCATCTACTACACGGACACCGACAGGGAACCCCGGCGTCTGCCGCCCAACGTCGCCCGCGGGTCAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
ZmPht1;4	245	CGCATCTACTACACGGACACCGACAGGGAACCCCGGCGTCTGCCGCCCAACGTCGCCCGCGGGGTCAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
PT6 (TC278)	223	CGCATCTACTACACGCTCGAGGGCTCCGCCAGCGCCGGCACTCTCCGCCGCAAGTGTCCGCGGCGTCAACGGCGTGGCCTTCGTGGGC
PT7 (TC61525)	1	-----
PT8 (TC164)	1	-----

Enchimento múltiplo de seqüências (Continuação).

```

ACGCTCTCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGTAAAGCCGCTCTATGGCATCAGCG
ACGCTCCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTCTACGGCATGAGCG
ACGCTCCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTGACGGGATGAGCG
ACCTCTCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTGACGGGATGAGCG
ACGCTCCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTGACGGGATGAGCG
ACGCTCCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTGACGGGATGAGCG
ACGCTCCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGGAAGAGCGCTGACGGGATGAGCG
ACGCTCTCAGGGGCACTCTTCTTTCGGCTGGCTGGGCGACAAGCTCGGCCGTAAAGAGCTCTATGGCATGAGCG

```

TGCTCGCTCGGCTCGGGCTCTCGTTTCGGCCACACCCCGACCTCGTCATGGCCACCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCGCTCGGCTCGGGGCTCTCGTTTCGGGGACACCGCCACGAGCGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCCATCGGCTCGGGGCTCTCGTTTCGCCACACCGCCACGAGCGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCCATCGGCTCGGGGCTCTCGTTTCGCCACACCGCCACGAGCGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCGCTCGGCTCGGGCTCTCGTTTCGGCCACACCCCGACGGGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCCGCTCGGCTCGGGCTCTCGTTTCGGCCACACCCCGACGGGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGCTCGCTCGGCTCGGGCTCTCGTTTCGGCCACACCCCGACGGGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT
TGTTCTGTCGCTCGGGGCTCTCGTTTCGGCCACACCCCGCTCGTCATGGCCACGCTCTGCTTCTTCCGCT

ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCGGCCACCACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGAGCGGTGGCGGCTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTCAGCGCCACCACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGACCGAGCCGCGGGGGGTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCCGCGACGATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA
ATCGGGCGGTGACTACCCGCTAGCGCCACCACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCCGCGACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCCGCGACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCCGCGACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA
ATCGGGCGGCGACTACCCGCTGTCCGCGACCATCATGTCCGAGTACGCCAACAGAAGACCCGCGCGCGGTTCA

[illegible]

GAGGACCCCGTGGCCTCCACGCCGCCGACGGCCGACTTCGTGTGGAGGATCATACTCATGCTGGCGCGCTGC
CGCCGACCCGCGCGGCTCCACCCGCCGAGGCCGACTACGTGTGGCGGCTCATCTCCATGTCGCGCGCGCTC
GACGACCCGCGCGGCTCCACCGTCCGCCGAGGCCGACTACGTGTGGCGGATCATCTCATGCTCGCGCGCATGCG
GTCTATGCGCGTGGCTCCACCGTGCCGACGGCCGACTACGTGTGGCGCATCATCTCATGCTCGGTCGCGCG
GACGACCACTTCACTCCACCGTGCCGACGGCCGACTACGTGTGGCGCATCATCTCATCTTGGCGCGCGCGCG
GACGACCACTTCACTCCACCGTGCCGACGGCCGACTTCGTGTGGCGGTCATCTCCATGCTCGCGCGCGCGCG
GACGACCACTTCACTCCACCGTGCCGACGGCCGACTACGTGTGGCGGTCATCTCATGCTCGCGCGCGCGCG
ATCGATCCGCGCGCTCCACGCCGCCGACGGCCGACTTCGTGTGGCGGATCATCTCATGCTGGCGGTGCG

TACTGGCGCACCAGATGCCCGAGACGGCGCGCTACACGGCGCTCGTGCCCAACACGCCAAGCAGGCCCGCGG
TACTGGCGGATGAGGATGCCCGAGACGGCGCGGTACACCGCCATCGTCGCCAAGAACGGGAGCGCTCGCGCGG
TACTGGCGGATGAAGATGCCCGAGACGGCGCGCTACACCGCCCTCGTCGCCAAGAACGCCAAGCAGGCCCGCGG
TACTGGCGGATGAAGATGCCCGAGACGGCGCGGTACACGGCGCTCGTCGCCAAGAACCGCAAGCAGGGGTCTG
TACTGGCGGATGAAGATGCCCGAGACGGCGCGCTACACCGCGCTCGTGCCCAAGAACGCCAAGCAGGCCCGCGG
TACTGGCGGATGAAGATGCCCGAGACGGCGCGGTACACGGCGCTGTTGGCCAAGAACGCCAAGCAGGCCCGCGG
TACTGGCTGATGAAGATGCCCGAGACGGCGCGGTACACGGCGCTGTTGGCCAAGAACGCCAAGCAGGCCCGCGG
TACTGGCGCACCAGATGCCCGAGACGGCGCGGTACACGGCGCTGTGGCCAAGAACGCCAAGCAGGGTSCGG

Figura 12. Alinhamento múltiplo de seqüências (Continuação).

OsPT6	796	CTGCAGGTGG---TGSACA-----TGGCTATATTTGGTTATATTTGGTGGCAGCA-----GGAG-GCCCTTC
OsPT7	781	CTCCAGGTGAGATCAAGG---CGGAGAGGCGGAGATGGCTTCGCCGTGGACAAGCCCTT-----CACCAGCAA-GCCCTTC
OsPT8	793	CTCCAGGTGAGATCCAGGA-----GGAGCAGGACAAGCTGGAGCGATGG---TGACCCGG-----AACAGCAG-CAGCTTC
OsPT12	787	CTGCAGGTGGATCCAGG-----TGGAGCAGGAGAAAGCTCCAGGACATCACCAGGG-----GCAG-GSACTAC
ZmPht1;1	898	CTCCAGACGGAGATCCGTCGA-----CGAGCAGGAGAAGCTGGACGATGGTCACCGCCGAG-----AGC---AA-CACCTTC
ZmPht1;2	832	CTGCACACGGAGATCCCTGGA-----CGAGCAGGAGAAGCTGGACGATGGTCGCCGCCGAG-----GGCGCCAA-CAGCTTC
ZmPht1;4	875	CTGCACACGGAGATCCCTGGA-----CGAGCAGGAGAAGCTGGACG-----CCGCCGAG-----CCGCCAA-CAGCTTC
PT6 (TC278)	853	CTGCAGGTGGAGATCCAGGAGCTTGTCTGCCAGGACAACAGCAACAGCGAGGCGCTCTTCGGCGGCTGCCGCCGCCGCTCTTC
PT7 (TC61525)	1	-----
PT8 (TC164)	1	-----CAA-CACCTTC
OsPT6	853	GGGCTCTTCTCCGGCAGTTTCTCCGCCGCCACGGGCTGCACCTGTTGGGCAGGTCCGCCGACGTGGTCTGCTGACATGGCTTCTAC
OsPT7	856	GGCCTCTTCTCCGGCAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGCTCTCTCTGGACATCGCCTACTAC
OsPT8	862	GGCCTCTTCTCCGGCAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGCTCTCTCTGGACATCGCCTTCTAC
OsPT12	850	GGCCTCTTCTCCGGCAGTTTCTCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGTTCCTCTCTGGACATCGCCTTCTAC
ZmPht1;1	967	GGGCTCTTCTCCGGGAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGCTCCACACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
ZmPht1;2	904	GGGCTCTTCTCCGGGAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
ZmPht1;4	938	GGGCTCTTCTCCGGGAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
PT6 (TC278)	943	GGGCTCTTCTCCGGGAGTTTCTCCGCCGCCACGGGCTGCACCTCTCTGGGCAGGTCCGCCGACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
PT7 (TC61525)	1	-----GGCGC---ACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
PT8 (TC164)	11	GGCCTCTTCTCCGGGAGTTTCGCCGCCGCCACGGGCTCCACCTCTCTGGGCAGACGTTCGACGTGGTTCCTGCTGACATCGCCTTCTAC
OsPT6	943	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
OsPT7	946	TCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
OsPT8	952	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
OsPT12	940	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
ZmPht1;1	1057	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCAACCACATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
ZmPht1;2	994	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCAACCACATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
ZmPht1;4	1028	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCAACCACATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
PT6 (TC278)	1033	TCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
PT7 (TC61525)	35	TCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCGACGATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
PT8 (TC164)	101	AGCCAGAACCTGTTCCAGAAGGACATCTTCACGACCGCTGGGG-TGGATCCCCAAGGCCAACCACATGAGCGCGCTGGAGGAGTGTTCGG
OsPT6	1032	CATCGGCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
OsPT7	1035	CATCGGCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
OsPT8	1041	CATCGGCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
OsPT12	1029	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
ZmPht1;1	1146	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
ZmPht1;2	1083	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
ZmPht1;4	1117	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
PT6 (TC278)	1123	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
PT7 (TC61525)	124	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
PT8 (TC164)	190	CATCTCCGCGCGCGCAGACGCTG-ATCGCGCTCTGCGGGACCGTGGCCGGGCTACTGGTTACCGTTCGCGCTCATCGACGT-GGTGGGCGG
OsPT6	1119	TTCACAGATCC--AGGCCCTTGGCTTCTTCATGATGACCGTCTTCATGCTCCCTTNGCCCTGCCGTACCACCACTGGAGC---GCGCCG
OsPT7	1122	GTTCAAGATCC--AGGCCGGGGGCTTCTTCTGATGACCGTCTTCATGCTCGCGCTGGCGGTGCCGTACCACTGGAGC---GCGCCG
OsPT8	1128	CTTCGCCATCC--AGCTGCTAGGCTTTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTCGCCGTGCCGTACCACCACTGGAGC---ACGAA
OsPT12	1116	CTTCAGATCC--AGCTCTCGGCTTCCGCGGATGACCGCTTCATGCTCGGCCTCGCCATCCCGTACCACCACTGGAGC---AGCCCT
ZmPht1;1	1233	CTTCGCCATCC--AGCTGCTCGGCTTCTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTCGCCATCCCGTACCACCACTGGAGC---ACGCC
ZmPht1;2	1170	CTTCGCCATCC--AGCTGCTGGGCTTCTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTCGCCATCCCGTACCACCACTGGAGC---ACGCC
ZmPht1;4	1204	CTTCGCCATCC--AGCTGCTGGGCTTCTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTCGCCATCCCGTACCACCACTGGAGC---ACGCC
PT6 (TC278)	1212	GTTCCCATCCCAAGCCAAAGGGGTTCTCTGAATAAACAAGGGGTTTATGGCG---GGGCTTGGCGG---CCCAACC---ACCA
PT7 (TC61525)	211	GTTCCCATCC--AGGCCAGGGGTTCTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTGGCGGTGCCGTACCACCACTGGAGC---ACGAA
PT8 (TC164)	277	CTTCGCCATCC--AGCTGCTGGGATTTCTTCATGATGACCGTGTTCATGCTCGGCCTCGCCATCCCGTACCACCACTGGAGC---ACGAA
OsPT6	1204	GGGAAGAACACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
OsPT7	1207	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
OsPT8	1213	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
OsPT12	1201	GGGAA---CCAGCTCTTCTTCTGCTTCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
ZmPht1;1	1318	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
ZmPht1;2	1255	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
ZmPht1;4	1289	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
PT6 (TC278)	1293	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
PT7 (TC61525)	299	GGGAA---CCACATCGGCTTCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG
PT8 (TC164)	362	GGGAA---CCACATCGGATTCGCTGCTGCTTACGGGCTTCACCTTCTTCTTCGCCAACTTCGGGCCCAACCTCCACCACCTTCATCGTGCCG

OsPT6	1294	GCGGAGATTTTCCCGGCGCGGCTCGCGGCCACGTGCCACGGCATCTCGCGCGCGTCGGGGAAGCTCGGGCGCATCTCGGATCTCTCGGG
OsPT7	1294	GCGGAGATATAACCGGCGGAGGCTCGCGCGCACTGCCACGGGATATCGCGCGCGTCGGGGAAGGTCGGGCGATCTCGGCTCTTTCGGG
OsPT8	1300	GCGGAGATCTTCCCGGCGGAGGCTCGCTTCCACCTGCCACGGCATCTCGCGCGCGTCGGGGAAGGCGCGGCCATCATCGGATCGCTTCGGG
OsPT12	1288	GCCGAGATCTTCCCGGCGGCTCTTCGGGCTCACTCGCCACGGCATCTCCGCGCGCTCGCGGAAGGCGCGGCCATCATCGGAGGATTCGCT
ZmPht1;1	1405	GCCGAGATCTTCCCGGCGGCGCTCGGCTCACTGCCACGGCATCTCCGCGCGCTCGGGGAAGGCGCGGCCATCATCGGGGCTTTTGGG
ZmPht1;2	1342	GCCGAGATCTTCCCGGCGGCACTGCGCTTCCACCTCTCACGGCATCTCCGCGCGCTCGGGGAAGGCGCGGCCATCATCGGCGCTTCGCG
ZmPht1;4	1376	GCCGAGATCTTCCCGGCGGCGCTGCGCTTCCACCTGCCACGGCATCTCCGCGCGCTCGGGGAAGGCGCGGCCATCATCGGCGCTTCGCG
PT6(TC278)		
PT7(TC1525)	386	GCGGAGATCTTCCCGGCGGAGGCTCGGCTCCACGTGCCACGGCATCTCGCGCGCGTCGGGGAAGCTCGGGCGCATCTCGGATCTCTTCGGG
PT8(TC614)	449	GCCGAGATCTTCCCGGCGGCGCTCGGCTCACTCGCCACGGCATCTCCGCGCGCTCGGGGAAGGCGCGGCCATCATCGGCGCTTCGGG

PT7 (TC61525) 476 T T C T C T G T A C T T G G C G C A G A C C G G G A C C G G G C A A G A C G G A G C A --- C G G G T A C C C T C G C G G G C A T C G G C G T G C G C A A C T C G C T G T T T C T C T C
PT8 (TC164) 539 T T C T C T G T A C G C G G C G C A G A A C C A G G A C A A G A G A A A G C C G G A C G C --- C G G G T A C C C T C G C G G G C A T C G G C G T G C G C A A C T C G C T C T T C G C T

OsPT6	1471	CTCGCGCGCTGCAAC	TGCTGGGCTGCTTTCACCT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCCGCGAC
OsPT7	1474	CTCGCGCGCTGCAAC	TGCTGGGCTTCTCTCTACCT	TCCTCTGTGCGCGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTGACCGGAG
OsPT8	1471	CTCGCGCGAGTCAAC	TGCTGGGCTTCATCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTCCGCGAG
OsPT12	1465	CTCGCGCGCTGCAAC	TGCTGGGTTCTCTATGACATGGAT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCCGCGGAC
ZmPht1;1	1582	CTCGCTTGCTTCAACT	TGCTTGGCTTTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTCCGCGGAG
ZmPht1;2	1519	CTCGCGCGCGCAAC	TGCTGGCTTCTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTGCTGAG
ZmPht1;4	1553	CTCGCGCGCAAC	TGCTGGGCTTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCCGCTGAG
PT6 (TC278)		CTCGCGCGCTGCAAC	TGCTGGGCTTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTGCTGAG
PT7 (TC61525) 563		CTCGCGCGCTGCAAC	TGCTGGGCTTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTGCTGAG
PT8 (TC164) 626		CTCGCTTGCTTCAAC	TGCTGGGCTTCTCTCACT	TCTCTGTCGCGGAGTCCAAGGGCAAGTCGCTG	GAGGAGATGTCTGCTGAG

OsPT6 1558 GCCGAGGCCAGGAGGAG-CCGCCGCCGC-----CGTGCAACCTGACTGTAGCGCTCTCGCCGCTGCATATCTATCTATATATACCT
 OsPT7 1561 AACGAGGTCGGCCAGCCGTGATCCACCCGTTAATTCACCGCGCTCGCTGTGCATCGAGATCCATGCATATCGCTGGTTA-GTCCACTA
 OsPT8 1558 GCCGAGGACGAGGACGAGCCAGCTGCCCGCC-----CCGCCGCTGGCGCCCGCTGCCCGCCAGAGCGGCTAGTGTATGCTCCACCGTGA
 OsPT12 1555 CGCCGACGAGGAAAGCTTCTGCCACCGCG-GGTGCCACCGCGCTCACTCCGCGAGTTGAGTG-TGTGTAATCCTTCA-GGACGCCAA
 ZmPht1:1 1669 GCTGACGACGCCGAGGACGAGCCCGTCCGC-----ACCCGCG-CCGTGCGGCCGTCGCGGAGCCAGATGGGTAGAG-----ATCGAACATCG
 ZmPht1:2 1606 GCTGAAGACTCAGAGGAGGAGCCCGTCCGC-----CCCGCG-CCGTGCGGCCGTCGCGGAGCCAGATGGGTAGAG-----ATCGATCG-AT
 ZmPht1:4 1640 GCTGAAGACTCAGAGGAGGAGCCCGTCCGC-----CCCGCG-CCGTGCGGCCGTCGCGGAGCCAGATGGGTAGAG-----ATCGATCG-AT
 PT6 (TC278) -----
 PT7 (TC1525) 650 AACGACGCA-----
 PT8 (TC164) 713 GCTGACGACGCCGAGGAGGAGCCCGTCCGC-----AGCCGCG-CCGTGCGGCCGTCGCGGAGCCAGATGGGTAGAAATC-GTCCACCGTGA

OsPT6 1642 GCAGATTTTATCCACCATATAATAAAGCTGT---CGATCGAGACCGAGAAATCGATCGAACAACCCCACTGTGATATATAAATGGC
 OsPT7 1650 GAGATTTTTGTTCTCTTTTCTAGAAATCCAT---TGGAATGCATGTGTTCTTTTTTTTCTCAGATCCATTAGAGGCGGAGATGATGAAT
 OsPT8 1644 ATATA-STGTA-----GGTTTAACTAAATTTCTT-TACTGTTATTTATTAATATCTCTCACTCTGTGTTCTCTATGCTGAATTTG-GGAAT
 OsPT12 1642 CGAGATCAACACACACTTGCAGTGAAGTCTCTAC-TGTCGCGTGTACAGAAATGTATACCTATTTTATTAATGCTGACCTCTACTAG
 ZmPht1:1 1750 GCAGCCGTGCAACAGGGTCTCCATCTCTGGGCCCCGACTGGAA-GACAAGCGCCGCGGTTCAAGCC-TGCCATGCTTTG-CTGTG
 ZmPht1:2 1688 GCAGCCCTGT-----TCCCTCTGCG-----ACTGC-----ACATGGTGGGCTA-TCATGTC-CTCAATTGTTTTT-TTCCA
 ZmPht1:4 1722 GCAGCCCTGT-----TCCCTCTGCG-----ACTGC-----ACATGGTGGGCTA-TCATGTC-CTCAATTGTTTTT-TTCCA
 PT6 (TC278) -----
 PT7 (TC1525) -----
 PT8 (TC164) 797 GCAGCCGTGCAACAGGGTCTCGGTTCTTCTCTGCACTCCACATGGCAACAGTGTGAGGCGCCGCTTCAGTTGTTTCTGTTTCTT

OsPT6 1729 GTGCTATCCAC
 OsPT7 1737 -TATGCGCCGCCAATTATGTGTGACACAACTAGTAGTT--AGCTTAGGTG--AGTTTTCATATAATGAACACTATCATTAGACCTTCA
 OsPT8 1726 CATTAACCCATCAATCATGTTTGTGTAAGTAAGAAGCGCAACACAAATGTGTGTTAAATACCTTCAATTAATGTAACTCTGTTTTTAATGAT
 OsPT12 1731 -TACTATCATCACTATATGTTAGTACTGCGTTTTTACGTTACAGACTTCTCTT--GGTACCTCAAGTTGATCCCTAATTTTCGTACAAC
 ZmPht1;1 1835 CAGACTAGTGTCTGACAGGCGATGTTGTAT-AGCGCGCAAC--TAACTCACTTACACCTTGTAATTATTATTATC
 ZmPht1;2 1751 CGTTAA-AAAAAATAAAAAA--AAA-
 ZmPht1;4 1785 CGTTAA-AGTCAACCTTGGC---TGTCTTTTG-ACTCGCAAA-AAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
 PT6 (TC278)
 PT7 (TC61525)
 PT8 (TC164) 887 CATCTTAAGTCAAGCGCTGCGCCTCTCTTCGCTCTCCAGCACTA-----CAAGTCAAGCCTGCTCCCTCTGTTTTCATGTT

OsPT6		TGCTGATTCTGTTTCGGC	ACGAGGGGATCCTCGCGTCGTTCTCTTTTCTGT
OsPT7	1821	TTGGCCACTTGAGGA	TAACTCTTGACACCAACAATTTGGCAGCAATACATTTATAAATGAAC
OsPT8	1816	TTGGCCACTTGAGGA	TAACTCTTGACACCAACAATTTGGCAGCAATACATTTATAAATGAAC
OsPT12	1817	TAAATTAATTCATGCC	AAGATTGCTCAATTAATAGAAGCTATTCTAAACTTTTGTGGGATGCTCCTTGTATTTCATGTTACTTAAAC
ZmPht1;1	1912	CACCTTACGTAC	AAAAA
ZmPht1;2			
ZmPht1;4	1857	AAAAA	AAAAA
PT6			
PT7(TC61525)			
PT8 (TC164)	965	ACAGTCAAGCCTGCT	AACAGCGTCAAACTAGCGCGTTACGTATTTTCAACTTTAGGCCTCGTTCGGCAGCACTTGATTGGTGCCGGACC

Figura 13. RNAs escolhidos para síntese de cDNAs para os experimentos de qPCR. Os identificadores de no gel correspondem às plantas cultivadas com baixo (BP) ou alto Pi (AP), inoculadas (Gc) ou não com fungo *G. clarum* e coletadas aos 58 dpi. Eletroforese em 1,7 % de agarose em tampão SB (NaOH e ácido bórico, pH 8). Marcador molecular (MM) *RNA Ladder Low Range* (Fermentas) (**A**). Descrição dos volumes de RNA (2 μg) para síntese dos cDNAs (**B**).

O funcionamento dos iniciadores foi verificado em testes preliminares em PCR convencionais. Os genes *PT6*, *PT7*, *PT8*, e as *UbiQ1* e *UbiQ2* obtiveram fragmentos de tamanhos esperados amplificados a partir dos respectivos cDNA. Esses resultados estão ilustrados na Figura 14, com os produtos do *PT6*, *PT7*, *PT8* e *UbiQ2* amplificados a partir de raiz de cana cultivadas em hidropônica com diferentes doses de Pi (0, 50 e 250 μM). A

amplificação de amostras de DNA genômico confirma não haverem íntrons na região de amplificação dos genes *PT6*, *PT7*, *PT8* e *UbiQ2* quando comparados aos amplicons dos respectivos cDNAs.

Figura 14. Teste de iniciadores dos genes *PT6*, *PT7*, *PT8* e *UbiQ2* cujos produtos possuem 144, 103, 106 e 159 pb, respectivamente. Amplificação dos cDNA a partir de amostras de RNA de raízes cultivadas com 0, 50 e 250 μ M de Pi. Também foram aplicadas amostras da amplificação do DNA genômico de cana (G), do branco (b, sem DNA molde). Marcador de peso molecular (M) 100 bp Ladder.

Testes preliminares na plataforma de qPCR demonstraram um perfil de amplificação e uma curva de dissociação não características para o *PT6*. Nos testes de amplificação em PCR convencional foi detectada uma amplificação inespecífica para os iniciadores do *PT6* (Figura 14), posteriormente confirmada pelo gráficos da curva de dissociação (dados não mostrados). A amplificação via qPCR obtinha altos valores de Ct, dificultando sua quantificação. Portanto não foram obtidos resultados de expressão confiáveis da análise do *PT6*.

Considerando o gene *UbiQ1* como referência, a expressão relativa dos genes transportadores de fosfato de cana *PT7* e *PT8* foi avaliada em amostras de raiz fertilizadas com alto ou baixo Pi e coletadas aos 58 dpi com fungo micorrízico. Na Figura 15 podem ser observados os gráficos e valores de expressão (*ve*) relativa dos genes de interesse *PT7*, *PT8* e *Perox*, e do gene de referência *UbiQ1*. Os valores entre 0 e 1 indicam a supressão do gene, enquanto os valores acima de 1 indicam a indução de um gene, para a *UbiQ1* os valores de expressão são igual a 1.

Sob a deficiência de Pi, o transportador de fosfato *PT7* (*ve* = 6,8) foi induzido em raízes não colonizadas, já nas micorrízicas (*ve* = 4,0) foi pouco expresso. Em planta micorrízicas e cultivadas com alto Pi, o *PT7* (*ve* = 0,5) foi levemente suprimido, de forma similar ao *PT8* (*ve* = 0,5), enquanto em plantas micorrízicas e com baixo Pi o *PT7* (*ve* = 0,3) foi fortemente suprimido e o *PT8* (*ve* = 0,7) foi em menor intensidade, em relação a *UbiQ1* (*ve* = 1,0) (Figura 15). Este resultado sugere que altas taxas de colonização radicular suprimiram a expressão do *PT7*. O *PT8* pouco variou sua expressão, sendo sutilmente mais expresso em plantas micorrízicas do que nas não micorrízicas sob o suprimento de BP.

As plantas micorrízicas são potencialmente aptas a adquirir o fósforo por duas vias, diretamente via células epidérmicas da raiz ou pêlos radiculares e vai associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que levam o fósforo até o córtex da raiz. Estudos iniciais da utilização dessas duas vias indicavam que a absorção micorrízica do Pi contribui em pouco, e que a absorção de Pi pelas células da epiderme e pêlos radiculares era suficiente para suprir as necessidade da planta ^[70]. A utilização de radioisótopos para marcação do suprimento de Pi para hifas externas de fungos MA demonstrou ser considerável a contribuição da absorção micorrízica do fósforo em cevada (*Hordeum vulgare*) ^[179] e trigo (*Triticum aestivum*) ^[180], assim como em espécies “não responsivas” à micorrização ^[70].

O *PT7* e o *PT8* foram expressos em tratamentos de médio/longo prazo, apresentando expressão ou indução em resposta privação por Pi, o que é consistente com a função proposta de aquisição e mobilização de Pi para esta família de transportadores. Em arroz a

expressão dos respectivos ortólogos (*ORYsa;Pht1;7* e *8*) foi pouco evidenciada. Entretanto percebe-se que *ORYsa;Pht1;7* foi pouco expresso (0,15) em raízes não colonizadas e não detectado em raízes micorrízicas. O *ORYsa;Pht1;8* obteve uma expressão invariável entre plantas micorrízicas ou não ^[79]. Esses resultados corroboram com os observados para o *PT7* e *PT8* de cana-de-açúcar.

Em certos não cereais, a contribuição da aquisição micorrízica de Pi pode chegar a 100 %, e não estando diretamente relacionada com taxa de colonização das raízes ou com a capacidade de resposta micorrízica da planta em termos de crescimento e ou do total de Pi adquirido ^[135]. Smith et al. (2003) ^[70] observaram que o tomate (*Lycopersicon esculentum*, não responsivo), a mais as espécies responsivas como a linhaça (*Linus usitatissimum*) e *Medicago truncatula* receberam até 100 % do Pi absorvido via micorrizas arbusculares. Esse resultado é surpreendente pois, do ponto de vista agrícola, com base no conhecimento anterior, o papel das micorrizas tornava-se desinteressante em certos cereais não responsivos a FMA. A contribuição relativa dessas duas vias para a absorção total de Pi pela planta, assim como as funções dos diferentes transportadores de fosfato nessas vias são de extrema importância para compreensão das estratégias moleculares de resposta à deficiência de fósforo.

A cana-de-açúcar é uma gramínea pouco micotrófica, que apresentou variáveis taxas de colonização em função do tempo e dose de Pi. Os resultados da expressão do *PT7* indicam que este é induzido em raízes sob estresse por fósforo e provavelmente associado à absorção radicular de Pi. Enquanto o gene *PT8* possui uma modulação pouco variável provavelmente envolvido na manutenção do fluxo ou homeostase de Pi, possivelmente associado com a absorção radicular e micorrízica de fosfato.

A expressão diferenciada e a afinidade variável por Pi existente entre os transportadores de Pi induzidos por micorrizas induzem a se questionar sobre a origem ancestral e a evolução destes dois genes transportadores de P induzidos por micorrizas em batata. Os genes *MEDtr;Pht1;4*, *ORYsa;Pht1;11* e *SOLtu;Pht1;4* provavelmente evoluíram a

partir de uma mesma proteína ancestral existente antes da divergência entre mono e dicotiledôneas.

Contudo, a alta similaridade do gene *StPT3* com outros transportadores de fosfato, como o *StPT1* cuja expressão é constitutiva em todos os tecidos, sugere que um possível rearranjo no promotor do transportador *StPT3* provavelmente o tornou fortemente induzido por micorrizas quando é comparado a sua baixa expressão em tecidos não micorrízicos.

A expressão do transportador de fosfato *Pht1;11* de arroz ^[79] esta relacionada com presença de estruturas micorrízicas e, presumivelmente, envolvi a translocação de Pi para planta. O transportador de fosfato *MtPT4* é expresso na membrana peri-arbuscular da *Medicago truncatula* ^[163], logo entendi-se que seja responsável pela aquisição do fósforo absorvido pelo fungo. Assim recentes estudos têm identificado outros transportadores de fosfato similares em plantas micorrízicas ^[164, 165].

Devido a sintenia entre arroz e outros cereais como cevada e trigo espera-se que estes também possuam genes transportadores de fosfato induzidos por micorrizas e com similaridade de seqüência com transportador de fosfato de arroz *Pht1;11*. Oito genes da família *Pht1* foram identificados em cevada, sendo os genes *HORvu;Pht1;1*, *HORvu;Pht1;2*, *HORvu;Pht1;3* e *HORvu;Pht1;4* são predominantemente expressos em raízes e sua expressão é fortemente inibida quando a cevada é cultivada em solução nutritiva com alta disponibilidade de P comparada ao baixo fósforo ^[181, 182]. O transportador de *Pht1;6* de cevada teve sua expressão detectada em ramos de plantas não micorrízicas ^[77]. Para demonstrar o efeito diferencial da micorrização em transportadores de fosfato tipo *Pht1* a indução dos genes *HORvu;Pht1;8*, *TRlae;Pht1;myc* e *ZEAm;Pht1;6* de cevada, trigo e milho respectivamente, foi estudada com as técnicas de hibridização *in situ* e qPCR^[164]. Os resultado do qPCR confirmaram o observado *in situ*, mostrando valores crescentes de expressão destes genes em raízes colonizadas por *Glomus intraradices*, *Glomus* sp. WFVAM23 e *Scutellospora calospora* ^[164]. Estas evidências indicam que as plantas que formam micorrizas arbusculares com membros da família Glomeromicota desenvolveram

transportadores de fosfato que são especificamente ou preferencialmente envolvidos na aquisição de fósforo apoplástico de estruturas micorrízicas arbusculares intracelulares e de células do córtex da raiz. A ativação de transportadores de fosfato induzidos pela simbiose para a absorção micorrízica de Pi, aparentemente substitui, em parte, a absorção de transportadores de fosfato localizados na epiderme e pêlos radiculares.

As análises de *Southern* suportam os resultados de expressão observados para o *PT7* e *PT8* indicando que estes são membros diferentes da subfamília Pht1. Em análises de *Southern* dos genes de milho (*ZmPht1;1-6*), sondas específicas para cada genes revelaram em média 1 fragmento para a enzima *BamH* I e 2-3 para as enzimas *EcoR* I e *Hind* III ^[185], similares aos encontrados em cana de açúcar para os genes *PT7* e *PT8*, obtidos e dois eventos de hibridização independentes realizados com marcação não radioativa (Figura 17). Em um trabalho anterior foram encontrados vários fragmentos (8-10) para *Southerns* de transportadores de fosfato realizados com sondas de EST^[78]. Estes resultados com sondas não específicas possivelmente favoreceram o reconhecimento de regiões conservadas de isoformas ou alelos de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar. A hibridização para a peroxidase aqui mostrada, realizada a partir de uma sonda EST, revelam vários fragmentos (>2) para diferentes enzimas. Esse resultado reforça e sugere que sonda EST não gene-específicas podem reconhecer seqüências do mesmo cluster.

Fator Fixo: Dose P

Baixo Pi

Gc x ni (controle)

Alto Pi

Gc x ni (controle)

Fator Fixo: FMA

ni

BP x AP (controle)

Gc

BP x AP (controle)

E

Fator fixo	Trat.		Interesse				Referência		
	Controle	Perox	EP	PT7	EP	PT8	EP	UbiQ1	EP
Dose P									
20	ni	0,80**	0,5-1,3	0,30	0,2-0,5	0,73	0,6-1,0	1	0,7-1,5
200	ni	0,04**	0,01-0,21	0,51	0,3-0,8	0,54	0,3-0,8	1	0,7-1,4
FMA									
ni	200	1,2	0,7-2,0	6,78**	4,2-11,0	1,75**	1,3-2,3	1	0,7-0,6
Gc	200	22,15**	4,4-141,9	3,99**	2,4-6,3	2,39**	1,7-2,2	1	0,7-1,4
Eficiência da PCR (0-1)			0,70	0,90		0,77		0,99	

** valores significativos para $P < 0,05$, pelo teste de hipótese $P(H1)$, REST 2005 (Corbett Research Pty Ltd and Michael W. Pfaffl).

Figura 15. Expressão relativa dos genes Peroxidase (*Perox*) e transportadores de fosfato (*PT7* e *PT8*) em relação ao gene referência poli-ubiquitina (*UbiQ1*). Em raízes cultivadas com alto e baixo fósforo (BP e AP, respectivamente), colonizadas (Gc) ou não (ni) com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) aos 58 dpi. Gráficos: representação da expressão gênica comparando plantas colonizadas contra não inoculadas (**controle**), fixando-se as doses de baixo Pi (**A**) ou alto Pi (**B**); e confrontando as dose de baixo e alto Pi (**controle**) em raízes não inoculadas (**C**) ou colonizadas pelo fungo (**D**). As barras representam valor médio da expressão $\pm 25\%$; os limites extremos (**T**; **L**) os intervalos de confiança (95%) e as linhas pontilhadas a mediana. Tabela dos valores de expressão e intervalo que compreende o erro padrão. Médias de dois experimentos de qPCR, sendo utilizadas triplicatas de cada gene por experimento ($n = 3 \times 2$) (**E**).

Figura 16. Eletroforese dos produtos da reação da qPCR dos genes peroxidase (*Perox*), transportadores de fosfato (*PT7* e *PT8*) e da poliubiquitina (*UbiQ1*). As amostras são provenientes das raízes cultivadas com baixo (BP) ou alto Pi (AP), inoculadas (Gc) ou não com fungo *G. clarum* e coletadas aos 58 dpi. Produtos dos experimentos de qPCR I (amostras 1, 4, 7 e 10), II (2, 5, 8 e 11) e III (3, 6, 9 e 12). Também foram aplicadas amostras da amplificação do DNA genômico de cana (G), do branco (b, sem DNA molde) e da diluição serial 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} (P_1 , P_2 e P_3) do *Pool* de cada Experimento, respectivamente. Marcador de peso molecular (M) *PCR Marker* (New England Biolabs Inc.)

A aplicação em gel de eletroforese das amostras da qPCR permitiu verificar a amplificação de produtos únicos de cada gene como pode ser verificado em exemplos mostrados na Figura 16, assim como do produto de amplificação de amostras compostas para confecção das curvas de diluição serial. Esse resultados são coerentes com as curvas de dissociação de amostras dos genes *PT7*, *PT8*, *Perox* e *UbiQ1* (dados não mostrados).

Figura 17. Análise de *Southern* para os transportadores de fosfato e a peroxidase de cana-de-açúcar. Marcação não radioativa com “**sondas**” dos genes *PT7*, *PT8* e *Perox* (100-500 pb) produzidas com os iniciadores da Tabela 14. O DNA genômico foi digerido com as enzimas *EcoR* I (E), *Hind* III (H) e *Xba* I (I). Hibridização realizada a 60°C durante 15 horas e exposição do filme por 1 h. Marcador molecular λ -*Hind* III(λ , *Southern*) e *Ladder* 100 pb (M, “sondas”). Foram realizadas duas análises independentes para os genes *PT7* e *PT8*.

5. Conclusões

O *PT7* e *PT8* foram expressos em tratamentos de médio/longo prazo, apresentando expressão ou indução em resposta à privação por P_i , o que é consistente com prévios estudos que propõem uma função de aquisição e mobilização de P_i para esta família de transportadores. A cana-de-açúcar micorrízica mostrou alta plasticidade de resposta ao BP. Em síntese, se respostas positivas ou negativas do crescimento da planta ocorrem durante a simbiose dependerá de fatores limitantes do ambiente, do genótipo/combinção de planta e fungo, e portanto das estratégias moleculares e fisiológicas simbióticas que contribuem para “eficiência”.

6 REFERÊNCIAS

1. Tangsubkul N. Incorporating phosphorus management considerations into wastewater management practices. *Environ Sci Policy (Oxford)* 2005;8:1–15.
2. Runge-Metzger A. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. In: Tiessen, H. *Phosphorus in the global environment*. Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1995. p. 27–42.
3. von Uexküll HR, Mutert E. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil (Dordrecht)* 1995;171:1–15.
4. Driver, J. Phosphates recovery for recycling from sewage and animal wastes. *Phosphorus Potassium (London)* 1998;(216):17–21.
5. Stevenson FJ, Cole MA. *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients*. 2a ed. (New York): John Wiley and Sons; 1999.
6. Roberto, R. A cadeia produtiva da cana-de-açúcar. [forum]. *Visão Agrícola (Piracicaba)* 2004;1(1):4.
7. Bacchi, MRP. Agronegócio: A variabilidade dos preços do açúcar e do álcool em São Paulo. *Visão Agrícola (Piracicaba)* 2004;1(1):100–105.
8. Procana.com. Produção, Dados & Notícias. Conab prevê safra recorde em 2006/07. *JornalCana (Ribeirão Preto)* 2006;153:44. [citado em Dez 2006]. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/conteudo/EdicoesAnteriores.asp>>.
9. Poorter H. Plant growth analysis: towards a synthesis of the classical and the functional approach. *Physiol Plantarum (Oxford)* 1989;75(2):237–244.
10. Bohnert HJ, Gong Q, Li P, Ma S. Unravelling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr Opin Plant Biol (London)* 2006;9:180–188.
11. Wahid A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J Plant Res (Tokyo)* 2007;120:219–228.
12. Raghothama KG. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Biol (Palo Alto)* 1999;50:665–693.
13. Preiss J. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by othophosphate and triose-phosphates. *Trends Biochem Sci (London)* 1984;9:24–27.
14. Walker DA, Sivak MN. Photosynthesis and phosphate: a cellular affair? *Trends Biochem Sci (London)* 1986;11:176–179.
15. Novais RF, Smyth TT. *Fósforo em solo e planta em condições tropicais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1999.
16. Malavolta E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: Agronômica Ceres; 1980.
17. Mengel K, Kirkby EA. *Principals of plant nutrition*. Dordrecht: Kluwer Academic; 2001.
18. Volkwiess SJ, Raij B. Retenção e disponibilidade de fósforo em solos. In: *Simpósio sobre o Cerrado*; 4; 1976; Brasília, BR. *Bases da utilização agrícola*. Belo Horizonte: Itatiaia, 1977. p. 317–332.
19. Fassbender HW. *Química de suelos com enfasis em suelos de América Latina*. San Jose: IICA; 1986.

20. Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil (Dordrecht)* 2001;237:173-195.
21. Bielecki RL. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Biol (Palo Alto)* 1973;24:225-252.
22. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol (Rockville)* 1998;116:447-453.
23. Horst WJ, Kamh M, Jibrin JM, Chude VA. Agronomic measures for increasing P availability to crops. *Plant Soil (Dordrecht)* 2001;237:211-233.
24. Holford ICR. Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. *Aust J Soil Res (Collingwood)* 1997;35:227-239.
25. Smith SE, Robson AD, Abbott LK. The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. *Plant Soil (Dordrecht)* 1992;146:169-179.
26. Araújo AP. Eficiência vegetal de absorção e utilização do fósforo, com especial referência ao feijoeiro. In: Novais R, Alvares VH, Schaefer CEGR. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: SBCS; 2000. p. 163-212.
27. Föhse D, Classen N, Jungk A. Phosphorus efficiency in plants. 1. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different species. *Plant Soil (Dordrecht)* 1988;110(1):101-109.
28. Batten GD. A review of phosphorus efficiency in wheat. *Plant Soil (Dordrecht)* 1992;146:163-168.
29. Fernandez C. Eficiências de diferentes culturas e híbridos de milho quanto à utilização de fósforo em solos de cerrado. [dissertação] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo; 2001.
30. Siddiqi MY, Glass AD. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization and efficiency in plants. *J Plant Nut (Philadelphia)* 1981;4:289-302.
31. Pereira PRG. Estudo da eficiência de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares para a soja em amostra de um latosolo. [dissertação] Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1986.
32. Plaxton WC, Carswell MC. Metabolic Aspects in Phosphate Starvation Response in Plant. In: Lerner, H.R. *Plant responses to environmental stresses from phytohormones to genome reorganization*. New York: Marcel Dekker; 1999.
33. Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plantarum (Oxford)* 1994;90:791-800.
34. Plaxton WC. The organizations and regulations of plant glycolysis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol (Palo Alto)* 1996;47:185-214.
35. Preiss J. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. *Trends Biochem Sci (London)* 1984;9(1):24-27.
36. Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM. Regulation of amount of starch in plant tissue by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science (Washington)* 1992;258:287-289.
37. Nart L. Mineral nutrients – a ubiquitous stress factor for photosynthesis. *Photosynthetica (Prague)* 1992;27(3):271-294.

38. Mimura T. Homeostasis and transport of inorganic-phosphate in plants. *Plant and Cell Physiol* (Oxford) 1995;36(1):1-7.
39. Sakano K, Matsumoto M, Yazaki Y, Kiyota S, Okihara K. Inorganic-phosphate as a negative conditioning factor in plant-cell culture. *Plant Sci* (Clare) 1995;107(1):117-124.
40. Mimura T, Sakano K, Shimmen T. Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell and Environ* (Oxford) 1996;19(3):311-320.
41. Foyer C, Spencer C. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves - effects on intracellular ortho-phosphate distribution, photosynthesis and assimilate partitioning. *Planta* (New York) 1986;167(3):369-375.
42. Lauer MJ, Blevins DG, Sierzputowskagracz H. ³¹P-nuclear magnetic-resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine-max* L.) as affected by phosphate nutrition *Plant Physiol* (Rockville) 1989;89(4):1331-1336.
43. Lee RB, Ratcliffe RG. Phosphorus-nutrition and the intracellular-distribution of inorganic-phosphate in pea root-tips - a quantitative study using ³¹P-NRM. *J Exp Bot* (Oxford) 1983;34(146):1222-1244 .
44. Fredeen AL, Rao IM, Terry N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partition in *Glicine-max*. *Plant Physiol* (Rockville) 1989;89(1):225-230.
45. Cogliatti DH, Clarkson DT. Physiological-changes in, and phosphate-uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. *Physiol Plantarum* (Oxford) 1983;58(3):287-294.
46. Theodorou ME, Plaxton WC. Induction of PPI-dependent phosphofructokinase by phosphate starvation in seedlings of *Brassica nigra*. *Plant Cell Environ* (Oxford) 1994;17(3):287-294.
47. Horst WJ, Kamh M, Jibrin JM, Chude VO. Agronomic measures for increasing P availability to crops. *Plant Soil* (Dordrecht) 2001;237(2):211-223.
48. Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource . *New Phytol* (Oxford) 2003;157(3):423-447.
49. Uhde-Stone C, Gilbert G, Johnson JMF, Litjens R, Zinn KE, Temple SJ, Vance CP, Allan DL. Adaptation of White lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. *Plant Soil* (Dordrecht) 2003;248(1-2):99-116.
50. Uhde-Stone C, Zinn KE, Ramirez-Ya´ñez M, Li A, Vance CP, Allan DL. Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of White lupin in response to P deficiency. *Plant Physiology* (Rockville) 2003;131(3):1064-1079.
51. Marschner H, Romheld V, Cakmak I. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J Plant Nutr* (Philadelphia) 1987;10:1175-1184.
52. Neumann G, Martinoia E. Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* (London) 2002;7:162-167.
53. Lynch J. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* (Rockville) 1995;109:7-13.
54. Gilroy S, Jones DL. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci* (London) 2000;5:56-60.
55. Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH, Leyser HM. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* (Rockville) 2001;126:875-882.

56. Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. P Natl Acad Sci USA (Washington) 1996;93: 0519–10523.
57. Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier JW. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. Plant Cell (Rockville) 1997;9:381–392.
58. Liu C, Muchhal VS, Mukatira U, Kononowicz AK, Raghothama KG. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. Plant Physiol (Rockville) 1998;116:91–99.
59. Liu J, Uhde-Stone C, Li A, Vance CP, Allan DL. A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Soil (Dordrecht) 2001;237:257–266.
60. Tadano T, Sakai H. Secretion of acid phosphatase by roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. Soil Sci Plant Nutr (Tokio) 1991;37:129–140.
61. Louis I, Racette S, Torrey JG. Occurrence of cluster roots on *Myrica cerifera* L. (Myricaceae) in water culture in relation to phosphorus nutrition. New Phytol (Oxford) 1990;115(n.esp):311–317.
62. Dinkelaker B, Hengeler C, Marschner H. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. Acta Bot (Stuttgart) 1995;108:169–276.
63. Skene KR. Pattern formation in cluster roots: some developmental and evolutionary considerations. Ann Bot (London) 2000;85:901–908.
64. Paul MJ, Stitt M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. Plant Cell Environ (Oxford) 1993;16(9):1047–1057.
65. Ciereszko I, Gniazdowska A, Mikulska M, Rychter AM. Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. J Plant Physiol (Stuttgart) 1996;149(3-4): 343–348.
66. Smith FW, Ealing PM, Dong B, Delhaize E. The cloning of two Arabidopsis genes belonging to a phosphate transporter family. Plant J (Oxford) 1997;11:83–92.
67. Smith FW. The phosphate uptake mechanism. Plant Soil (Dordrecht) 2002;245:105–114.
68. Raghothama KG. Phosphate transport and signaling. Curr Opin Plant Biol (London) 2000;3(3):182–187.
69. Karandashov V, Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. Trends Plant Sci (London) 2005;10(1):22–29.
70. Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plant irrespective of growth responses. Plant Physiol (Rockville) 2003;133:16–20.
71. Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M. Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from Arabidopsis. Plant Cell (Oxford) 1999;11:2153–2166.
72. Poirier Y, Bucher M. Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis, In: Somerville CR, Meyerowitz EM. ed.: The Arabidopsis Book (Rockville): American Society of Plant Biologists; 2002.1-35 [cited 2006 Set 20] Available from: doi: 10.1199/tab.0024.
73. Kai M, Masuda Y, Kikuchi Y, Osaki M, Tadano T. Isolation and characterization of a cDNA from *Catharanthus roseus* which is highly homologous with phosphate transporter. Soil Sci Plant Nutr (Tokio) 1997;43:227–235

74. Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* (New York) 1998;206:225–233.
75. Liu H, Trieu AT, Blaylock LA, Harrison MJ. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant Microbe In* (St Paul) 1998 ;11:14–22.
76. Chiou TJ, Liu H, Harrison MJ. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interace. *Plant Journal* (Oxford) 2001;25:281–293.
77. Rae AL, Cybinski DH, Jarmey JM, Smith FW. Characterization of two phosphate transporters from barley: evidence for diverse function and kinetic properties among members of the *Pht1* family. *Plant Mol Biol* (Dordrecht) 2003;53(1):27–36.
78. Almeida RS. Caracterização de genes de transportadores de fosfato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” da Universidade de São Paulo; 2003.
79. Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *P Natl Acad Sci USA* (Washington) 2002;99:13324–13329.
80. Muchhal US, Raghothama KG. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* (Washington) 1999;96:5868–5872.
81. Kistner C, Parniske M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* (London) 2000;7:511–518.
82. Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* (London) 2000;3(4):320–328.
83. Bolan NS. A critical-review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* (Dordrecht) 1991;134(2):189–207.
84. Harrison MJ. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* (Palo Alto) 1999;50:361–389.
85. Moreira FMS, Siqueira JO. Micorrizas. In: *Microbiologia e bioquímica do solo*; Lavras: UFLA; 2006. p. 543–661.
86. Paszkowski U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* (Oxford). 2006;172:35–46.
87. Guimil S, Chang HS, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, et al. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization *P Nat Acad Sci USA* (Washington) 2005;102(22):8066–8070.
88. Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany* (Montreal) 2004;82:1186–1197.
89. Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* (London) 2005;435:824–827.
90. Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* (Rockville) 2005;139:920–934.

91. Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* (Palo Alto) 2005;59:19-42.
92. Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Denarie J, Barker DG, et al. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* (Rockville) 2003;131:952-962.
93. Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* (Rockville) 2005;7:3489-3499.
94. Vance CP. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* (Rockville) 2001;127:390-397.
95. Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* (Oxford) 2003;157(3):423-447.
96. Alexander AG. Sugarcane physiology: a comprehensive study of the *Saccharum* source-to-sink system. Amsterdam. Elsevier. 1973.
97. Takahashi D. Análise de seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* [tese] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' da Universidade de São Paulo; 2005.
98. Sousa SL. Análise do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva a micorriza arbuscular [tese] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' da Universidade de São Paulo; 2006.
99. Siqueira JO, Franco AA. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS/Lavras; ESAL/ FAEPE; 1988.
100. Siqueira JO, Colozzi-filho A, Oliveira E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. *Pesqui Agropecu Bras* (Brasília) 1989;24(12):1499-1506.
101. Reis VM, Paula MA, Döbereiner J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. *Pesqui Agropecu Bras* (Brasília) 1999;34(10):1933-1941.
102. Lewis DH. Symbiosis and Mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In: Boucher DH, (ed). *The biology of mutualism. Ecology and evolution*. New York: Oxford University Press. 1985. 29-39.
103. Johnson NC, Graham JH, Smith FA. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol* (Oxford). 1997;135(4):575-585.
104. Koch KE, Johnson CR. Photosynthate partitioning in splitroot citrus seedlings with mycorrhizal and non mycorrhizal systems. *Plant Physiol* (Rockville) 1984;75(1):26-30.
105. Peng S, Eissenstat DM, Graham JH, Williams K, Hodge NC. Growth depression in mycorrhizal citrus at high phosphate supply. *Annals of carbon costs*. *Plant Physiol* (Rockville) 1993;101(3):1063-1071.
106. Siqueira JO, Adrade AT, Faquin V. O papel dos microrganismos na disponibilidade e aquisição de fósforo pelas plantas. In: Yamada S, Stipp SR, Abdalla. *Anais do Simpósio sobre Fósforo na Agricultura Brasileira*. Piracicaba: POTAFOS. 2004. 119-149.

107. Miranda JCC, Souza DMG, Miranda LN. Influência dos fungos endomicorrízicos vesicular-arbusculares na absorção e rendimento de matéria seca de plantas de sorgo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* (Campinas) 1984;8(1):31-36.
108. Souza SL. Análise do proteoma do fluido intra-radicular de cana-de-açúcar colonizada por *Glomus clarum* [dissertação] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' da Universidade de São Paulo; 2002.
109. Lynch JP, Ho MD. Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant Soil* (Dordrecht) 2005;269(1-2):45-56.
110. Nielsen K L, Bouma T J, Lynch JP, Eissenstat DM. Effects of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the carbon budget of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol* (Oxford) 1998;139:647-656.
111. Nielsen K L, Eshel A, Lynch JP. The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *J. Exp. Bot.* (Oxford) 2001;52:329-339.
112. Reich PB. Root-shoot Relations: Optimality in acclimation and adaptation or the 'Emperor's New Clothes'? In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. *Plant Roots: The Hidden Half*. New York: Marcel Dekker 2002.
113. SARRUGE JR. Práticas de Nutrição Mineral de Plantas. Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. Piracicaba; ESALQ/USP: 1970.
114. Hoagland DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: University of California. Agriculture Experimental Station 1950 (Circular 347).
115. Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi *Appl Environ Microb* (Washington) 1998;64(12):5004-5007.
116. Giovannetti M, Mosse B. Evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* (New York) 1980;84(3):489-500.
117. Reis GG, Muller MW. Análise do crescimento das plantas e mensuração do crescimento. Belém; CPATU: 1979.
118. Pereira AR, Machado EC. Análise quantitativa do crescimento das plantas. Campinas; Instituto Agrônomo: 1987.
119. Jones GPD, Blair GJ, Jessop RS. Phosphorus efficiency in wheat – useful selection criterion? *Field Crop Res* (Amsterdam) 1989;21:257-264.
120. Siddiqi MY, Glass ADM. Utilization index - a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Journal Plant Nutr* (Philadelphia) 1981;4(3):289-302.
121. McCready RM, Walter ED, Maclay WD. Sugars of citrus juices. *Food Technol-Chicago* (Chicago) 1950;4(1):19-20 1950.
122. Dubois M, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* (Washington) 1956;28:350-355.
123. Stancato GC, Mazzafera P, Buckeridge MS. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiol Bioch* (Paris) 2001;39(11):1009-1016.
124. Malavolta E. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba; POTAFOS: 1997.

125. Raij B van, Cantarella H. Outras culturas industriais. In: Raij B van, Cantarella H, Quaggio JÁ, Furlani AMC. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: Fundação IAC. 1997. 233-243.
126. Malavolta E. Fósforo na planta e sua interação com outros elemnetos. In. Yamada S, Stipp SR, Abdalla. Anais do Simpósio sobre Fósforo na Agricultura Brasileira. Piracicaba: POTAFOS. 2004. 107-114.
127. Hardoim RP. Formação de micorrizas e análise do transcriptoma de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicida [dissertação] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo; 2006.
128. AS, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC, Raghothama KG. Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. *Planta* (New York) 2007;225(4):907-918.
129. Siqueira JO. Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi [tese] Florida: University of Florida; 1983.
130. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* (Bradley Stoke) 2000;25:169–193.
131. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* (Bradley Stoke) 2002;29:23–39.
132. Bustin SA. Review: Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* (Bradley Stoke) 2005;34: 597–601.
133. ABI Applied Biosystems. Classical Block Pcr & Rt-Pcr. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR, tutorial. [citado 21 ago 2006]. Disponível em: <http://www.gene-quantification.info/>.
134. Corbett Research. ROTOR GENE 3000. Real Time Summary: Overview of the Chemistries and Optimizations, version 1.7. Mortlake; 2007. [citado 13 maio 2003]. Available from: <http://www.corbettlifescience.com>.
135. Fitter AH. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function *New Phytol* (Oxford) 2006;172(1):3-6.
136. The Ambion®. The RNA company®. TechNotes (8)1: Real-time PCR Goes Prime Time. [citado 16 fev 2007]. Available from: <http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html>.
137. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun* (London) 2005;6(4): 279-284.

138. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol (London)* 2002;3:research0034.1-0034.11.
139. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization. applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res (Philadelphia)* 2004;64:5245-5250.
140. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Res (Oxford)* 2002;30(9): Art No e36.
141. Corbett Research Ptd Ltd: Corbett Research Life Science. Australia. Sydney [citado 2007 Mar 20] Disponível em: www.corbettresearch.com.
142. Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Arruda P. The libraries that made SUCEST. *Genet Mol Biol (Ribeirao Preto)* 2001;24(1-4):1-7.
143. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol (New York)* 2002;30:503-512.
144. Bustin AS, Nolan T. Pitfalls of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Techniques (New York)* 2004;15:155-166.
145. Heckmann LH, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM, Callaghan A. Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics (London)* 2006;7(175):1-8.
146. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative realtime PCR. *Biochem Bioph Res Co (San Diego)* 2004;313:856-862.
147. Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human Tlymphocytes. *Scand J Immunol (Oxford)* 2004;59:566-573.
148. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single

- housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* (San Diego) 2002;309:293–300.
149. Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* (Dordrecht) 2003;25:1869–1872.
 150. Molecular Bioogy Full Edition, Cap. 21, Promoters and Enhancers, Benjamin Lewin. Disponível em: <http://www.ergito.com/>. Acessado em 20 de março de 2007. Verificar autor do livro, não sei se é o Benjamin
 151. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* (Amsterdam) 1999;75:291-295.
 152. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* (Dordrecht) 2004;26(6):509-515.
 153. Bunya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. The *Pho84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* (Washington) 1991;11:3229–3238.
 154. Harrison MJ, Van Buuren ML. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* (London) 1995;378:626–629.
 155. Mann BJ, Bowman BJ, Grotelueschen J, Metzenberg RL. Nucleotide-sequence of PHO-4+, encoding a phosphate-repressible phosphate permease of *Nurospora-crassa*. *Gene* (Amstrdam) 1989;83(2):281-289.
 156. Martinez P, Persson BL. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol General Genetics* (Stockholm) 1998;258(6):628-638.
 157. Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis *Plant Journal* (Oxford) 2002;1(3):341-353.
 158. Figueira A, Kido EA, Almeida RS. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators, *Genet Mol Biol* (Ribeirao Preto) 2001;24:207-220.

159. Nogueira FTS, De Rosa Jr VE, Menossi M, Ulian E, Arruda P. RNA expression profile and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol (Rockville)* 2003;132:1811-1824.
160. Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Lalol M, Leggewie G, et al. Aphosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature (London)* 2001;414:462-466.
161. Rosewarne GM, Barker SJ, Smith SE, Smith FA, Schachtman DP. A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (*LePT1*) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist (New York)* 1999;44(3):507-516.
162. Karandashov V, Nagy R, Wegmuller S, et al. Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Proc Nat Acad Sc USA (Washington)* 2004;101(16):6285-6290.
163. Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell. (Rockville)* 2002;14: 2412-2429.
164. Glassop D, Smith AE, Smith FW. Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta. (New York)* 2005; 222(n.esp.): 688-698.
165. Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, et al. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J. (Oxford)* 2005;42:236-250.
166. Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B, Raghothama KG. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters *Plant Physiology (Rockville)* 2002;130(1):221-233.
167. Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, et al. Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol (Rockville)* 2003;132:578-596.
168. Mukatira UT, Liu C, Varadarajaram DK, Raghothama KG. Negative regulation of phosphate starvation-inducible genes. *Plant Physiol (Rockville)* 2001;127:1854-1862.

169. Rossel JB, Wilson IW, Pogson BJ. Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* (Rockville) 2002;130(3):1109-1120.
170. Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J. A conserved MYB transcription factor in phosphate starvation signaling both in vascular plants and unicellular algae *Gene Dev* (Woodbury) 2001;15(16):2122-2133.
171. Figueira SR. Os programas de álcool combustível nos EUA, Japão e União Européia e as possibilidades de exportação do Brasil [tese] Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz" da Universidade de São Paulo; 2005.
172. Sereno ML, Almeida RS, Nishimura DS, Figueira A. Response of sugarcane to increasing concentrations of copper and cadmium and expression of metallothionein genes. *J Plant Physiol* 2006. [cited 2006 Set 20] Available from: [doi:10.1016/j.jplph.2006.09.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2006.09.007)
173. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *AnaleBiochem* (San Diego) 1987;162:156-159.
174. Palmer M. Randomization tests: the use of randomly generated numbers for statistical inference. Stillwater: Botany Department, Oklahoma State University. [citado 20 mar 2007] Available from <http://ordination.okstate.edu/permute.htm>.
175. Wang JL, Jiang JD, Oard JH. Structure. expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* (Clare) 2000;156:201-211.
176. Brody JR, Kern SE. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* (Westborough) 2004;36(2):214-216.
177. Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* (Athens) 2004;22: 325-337.
178. Calsa Júnior T. Análise transcricional da folha e do parênquima de colmo de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) contrastes para teor de sacarose e estágio de maturação por meio serial (SAGE) [tese] Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo; 2005.

179. Zhu YG, Smith FA, Smith SE. Phosphorus efficiencies and responses of barley (*Hordeum vulgare* L.) to arbuscular mycorrhizal fungi grown in highly calcareous soil Mycorrhiza (New York) 2003;3 (2):93-100.
180. Schweiger e Jakobsen 2000
181. Rosewarne GM, Barker SJ, Smith SE, et al. A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus New Phytol (Oxford) 144 (3): 507-516 DEC 1999
182. Schunmann PHD, Richardson AE, Smith FW, et al. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.) J Experimental Bot (Oxford) 2004;5(398):855-865.
183. Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. New Phytol. (Oxford) 2004;162:511–524.
184. Zhang Z, Gurr SJ. Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. Gene (Amsterdam) 2000;253;145–150.
185. Nagy R, Vasconcelos MJV, Zhao S, McElver J, Bruce W, Amrhein N, et al. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.) Plant Biol (Stuttgart) 2006;8(2):186-197.
186. Radonic A. Thulke S, Bae H, Müller MA, Siegert W, Nitsche A. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus. Yellow fever virus. Human Herpesvirus-6. Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. Virol J (London) 2005;2:7.
187. Wang J, Oard JH. Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. Plant Cell Rep (New York) 2003;22(2):129-134.
188. Dheda K, Huggett JF, Bustin AS, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. BioTechniques (Westborough) 2004;37:112-119.

189. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin AS, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem (San Diego)* 2005;344:141–143.
190. Gilsbach R, Kouta OM, Bönisch H, Brüss M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques. (Westborough)* 2006;40:173-177.
191. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol (Rockville)* 2005;139:5–17.