

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

**Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas**

**Pablo Rodrigo Hardoim**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba  
2006**

Pablo Rodrigo Hardoim  
Engenheiro Agrônomo

Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba**  
**2006**

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

Hardoim, Pablo Rodrigo

Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas / Pablo Rodrigo Hardoim. - - Piracicaba, 2006.  
90 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cana-de-açúcar 2. Esporo – Germinação 3. Fungo micorrízico 4. Herbicidas  
5. Híbridaçãõ de ácido nucleíco 6. Raiz I. Título

CDD 633.61

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

**Ofereço,**

*À DEUS, o único digno de toda honra, toda glória e de todo o poder.*

A minha amada esposa,  
aos meus pais, irmãos e familiares,

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela oportunidade de realização deste projeto, pela orientação e pela confiança depositada.

À CAPES e à FAPESP pelas bolsas concedidas.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

À Coordenação do PPG dos Solos e Nutrição de Plantas e à ESALQ pela oportunidade da realização do mestrado.

À colega de trabalho Daniele Takahashi pelo apoio, orientação e fornecimento de grande parte do material utilizado na experimentação deste trabalho, sem o qual seria impossível a realização do mesmo em tempo hábil.

À Profa. Dra. Elke Cardoso, por permitir o uso das instalações do Laboratório de Microbiologia de Solos.

Ao Prof. Dr. Luiz L. Coutinho, por permitir o uso das instalações do Laboratório de Biotecnologia Animal. E, à sua equipe técnica: Nirlei e Jorge, assim como aos Clarissa, Érica Jorge e Millor pela valiosa colaboração durante a condução dos experimentos radioativos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular: Carolina, Gisele, Hélio, Juliano, Lucas, Marcio, Rafael, Robinson, Simão e Soraya pela amizade e momentos inesquecíveis.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia de Solos: Denise e Fernando pela amizade construída e pelo imensurável apoio durante a condução dos experimentos.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia Molecular Wladimir pelo apoio na condução do experimento.

Ao Cláudio de Mello pela implementação dos procedimentos para a análise de estatísticas dos macroarranjos.

À minha família, Paulo C. Hardoim e Edimar I. P. Hardoim pela demonstração de amor e afeto apesar da distância. E aos meus irmãos Patrícia e Paulo Roberto pelo carinho demonstrado.

À minha querida esposa Cristiane C. P. Hardoim pelo amor e compreensão.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | 7  |
| ABSTRACT .....  | 8  |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 9  |
| Referências .....   | 11 |
| 2 EFEITO DA AMETRINA E DO IMAZAPIQUE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO CRESCIMENTO INTRARRADICULAR DE <i>Glomus clarum</i> EM CANA-DE-AÇÚCAR..... | 14 |
| Resumo .....  | 14 |
| Abstract.....   | 14 |
| 2.1 Introdução.....   | 15 |
| 2.2 Revisão bibliográfica.....  | 16 |
| 2.2.1 Cana-de-açúcar .....  | 16 |
| 2.2.2 Fungo micorrízico arbuscular.....   | 17 |
| 2.2.3 Ametrina.....   | 18 |
| 2.2.4 Imazapique.....   | 19 |
| 2.3 Material e métodos .....  | 22 |
| 2.3.1 Germinação de esporos.....  | 22 |
| 2.3.2 Quantificação da colonização intrarradicular .....  | 22 |
| 2.3.3 Ensaios em casa-de-vegetação.....   | 23 |
| 2.3.4 Determinação da biomassa seca de raiz e da parte aérea .....  | 24 |
| 2.3.5 Quantificação da área superficial e do comprimento das raízes.....  | 24 |
| 2.4 Resultados.....   | 24 |
| 2.4.1 Germinação de esporos em solos tratados com Ametrina.....   | 24 |
| 2.4.2 Taxa de colonização intrarradicular em cana-de-açúcar tratada com Ametrina .....  | 25 |
| 2.4.3 Produção de biomassa seca de raiz.....  | 26 |
| 2.4.4 Área e comprimento das raízes.....  | 27 |
| 2.4.5 Produção de biomassa seca da parte aérea .....  | 29 |
| 2.4.6 Germinação de esporos em solos tratados com Imazapique .....  | 31 |
| 2.4.7 Taxa de colonização intrarradicular em cana-de-açúcar tratadas com Imazapique .....   | 31 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.8 Produção de biomassa seca das raízes.....  | 34        |
| 2.4.9 Área superficial das raízes.....   | 35        |
| 2.4.10 Produção de biomassa seca da parte aérea .....  | 37        |
| 2.5 Discussão dos resultados .....   | 38        |
| 2.6 Conclusões.....  | 41        |
| Referências .....  | 42        |
| <b>3 PERFIL TRANSCRICIONAL DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS<br/>COM <i>G. clarum</i> E TRATADAS COM IMAZAPIQUE .....</b> | <b>48</b> |
| Resumo .....   | 48        |
| Abstract.....  | 48        |
| 3.1 Introdução.....  | 49        |
| 3.2 Revisão bibliográfica.....   | 50        |
| 3.2.1 Expressão gênica .....   | 50        |
| 3.2.2 Expressão gênica em <i>Saccharum</i> spp.....  | 52        |
| 3.2.3 Expressão gênica em MAs .....  | 53        |
| 3.3 Material e métodos.....  | 56        |
| 3.3.1 Ensaio em casa-de-vegetação .....  | 56        |
| 3.3.2 Extração de RNA.....   | 57        |
| 3.3.3 Preparo das sondas e hibridização em membranas de alta densidade .....   | 58        |
| 3.3.4 Análise estatística .....  | 59        |
| 3.3.5 Anotação de função dos genes.....  | 60        |
| 3.4 Resultados.....  | 60        |
| 3.5 Discussão dos resultados .....   | 72        |
| 3.5.1 Metabolismo de RNA e transcrição .....   | 73        |
| 3.5.2 Genes envolvidos no sistema de defesa.....   | 74        |
| 3.5.3 Genes relacionados a resposta à estresses .....  | 77        |
| 3.5.4 Genes relacionados a dinâmica celular.....   | 78        |
| 3.6 Conclusões.....  | 78        |
| Referências .....  | 78        |

## RESUMO

### **Formação de micorriza arbuscular e análise do transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas**

As micorrizas arbusculares (MAs) são simbioses mutualísticas entre alguns fungos do solo e raízes de plantas de notória importância tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas, pois contribuem para o aumento da absorção de nutrientes do solo e sua transferência para as plantas. As MAs podem promover o crescimento de várias plantas, dentre elas a cana-de-açúcar. Assim, fatores que restringem o desenvolvimento das MAs podem também restringir a produção das culturas agrícolas. Muito embora os herbicidas utilizados em sistemas agrícolas possam contribuir para a alteração das estruturas das comunidades de microrganismos no solo e o desenvolvimento de simbioses, pouco se sabe sobre seu efeito sobre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). O presente estudo teve por objetivo determinar o efeito dos herbicidas Ametrina e Imazapique na germinação de esporos de *Glomus clarum* e desenvolvimento de MA em cana-de-açúcar, bem como as alterações no transcrito de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* e cultivada em solo tratado com Imazapique. Ametrina não teve efeito significativo na germinação de esporos e colonização intrarradicular, nas doses avaliadas. Já, o aumento da concentração de Imazapique promoveu uma diminuição na germinação de esporos e aumento de colonização intrarradicular. Embora tenha sido observada maior taxa de colonização intrarradicular em plantas tratadas com Imazapique, a presença do fungo parece não ter aliviado os efeitos deletérios promovidos pelo uso do herbicida nas condições estudadas. Através de hibridização em macroarranjo de cDNA, foi possível detectar vários genes com expressão diferencial estatisticamente significativa em raízes micorrizadas e não- micorrizadas cultivadas em solo tratado com herbicida. Dentre as proteínas codificadas pelos genes com expressão induzida em raízes micorrizadas, em relação ao controle não-inoculado, se destacam um receptor de glutamato, uma metalotioneína, uma ATP sintase, e várias com função desconhecida. Já, dentre os genes com expressão suprimida estão: a proteína WALI7, uma proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, uma tubulina e uma remorina. Nas raízes não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique as proteínas codificadas pelos genes com expressão induzida são: um receptor de glutamato e uma proteína tipo lipase; e dentre as que foram suprimida está a proteína transcritase reversa. O Imazapique altera a expressão de vários genes modulados pela MA, dentre as proteínas codificadas por esses genes estão: uma ATP sintase, uma proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, uma poliubiquitina, uma tubulina, uma quinase de histidina e várias com função desconhecida. Os resultados indicam que a formação MA altera o programa genético das raízes de cana-de-açúcar e que o herbicida Imazapique altera a expressão dos genes relacionados à simbiose de cana-de-açúcar com *G. clarum*.

**Palavras-chave:** Fungo Micorrízico Arbuscular; S-triazinas; Imidazolinonas; germinação de esporos; macro arranjo; *Saccharum* spp.



## ABSTRACT

### **Arbuscular mycorrhizal formation and transcriptome analyses of sugarcane roots colonized by *Glomus clarum* in the presence of herbicides**

The arbuscular mycorrhizae (AM) are symbiotic root-fungus associations that play a key role in natural and agricultural ecosystems, through the enhancement of nutrients absorption in the soil and its transference into the plants. The AM may promote the growth of many plants, among them are the sugarcane. Even though the herbicide utilized in the agriculture system may contribute to soil microbial community alteration and the symbioses development, limited is know about the herbicide effects on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and on AM formation. The aim of the present work was to evaluate the Ametrine and Imazapic effects in the spores germination of *Glomus clarum* and AM development in sugarcane, as well transcriptome alterations of sugarcane roots colonized with *G. clarum* and growing in soil treat with Imazapic. It was not detected significant effect on the spores germination and intraradical colonization in the evaluated doses of Ametrine. Whereas, the enhance of Imazapic concentration promoted a decrease in the spores germination and increase of intraradical colonization. Although the higher intraradical colonization has been observed in the plants treat with Imazapic, the presence of the fungi seems not alleviated the damage effect promoted by the use of the herbicide, in these studies conditions. By macro array cDNA hybridizations, it was possible to detect several genes with differential expression statistically significant in AM plants, and plants not inoculated growing in soil treated with herbicide. Among the proteins codified by genes with induced expression in AM roots, compared to the control no-inoculated, are: a putative ionotropic glutamate receptor, a metallothionein-like protein, a ATP synthase and many others with unknown function. Whereas, among the proteins codified by genes with suppressed expression are: Wali7 protein, a ubiquitin-dependent protein catabolism, a tubulin alpha-1 chain and a remorin. In the no-inoculated roots growing in the soil treat with Imazapic the proteins codified by genes with induced expression are: a putative ionotropic glutamate receptor and a lipase-like; and the reverse transcriptase like protein was suppressed. The Imazapic treatment alter several gene expression modulated by AM, among the proteins codified by those genes are: a ATP synthase, a ubiquitin-dependent protein catabolism, polyubiquitin, a tubulin alpha-1 chain, a signal transduction histidine kinase and many others with unknown function. The results indicate the AM formation alter the sugarcane roots genetic program and that the Imazapic herbicide alter the gene expression related to symbioses between sugarcane with *G. clarum*.

**Keywords:** Arbuscular Mycorrhizal Fungi; S-triazines; Imidazolinone; spores germination; macroarray; *Saccharum* spp.

## 1 INTRODUÇÃO

“Relações simbióticas significam parcerias criativas. A Terra não pode ser vista nem como um ecossistema a ser preservado inalterado nem como um canteiro para ser explorado por razões egoístas e econômicas de curto prazo, mas como um jardim a ser cultivado para o desenvolvimento das próprias potencialidades da aventura humana”.

**René Dubos** (1901-1982), Bacteriologista.

Brasil, maior produtor e exportador de açúcar e álcool do mundo (BRASIL, 2006) possui 6,2 milhões de hectares em área plantada com cana-de-açúcar e safra colhida 2005/2006 e 423 milhões de toneladas de colmos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006). A agroindústria da cana gera dez bilhões de dólares por ano, um milhão de empregos diretos e é responsável pelo seqüestro de 20% da emissão de carbono de derivados do petróleo, exercendo forte impacto na economia, no desenvolvimento social e ambiental do nosso país (RODRIGUES, 2004).

A perspectiva de crescimento na produção total de cana para os próximos 10 anos é de 100%, dos quais aproximadamente 70% deverão ser provenientes de novas áreas plantadas (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006). A introdução da cultura em novas áreas de cultivo é sempre um desafio, devido à baixa fertilidade natural dos solos da região no centro-oeste e nordeste do país. Essas áreas são consideradas propícias para o cultivo da cana-de-açúcar por apresentarem: grandes extensões de terra plana, ideais para o cultivo mecanizado; clima favorável, temperaturas altas durante o dia e amenas durante a noite; e boa incidência luminosa ao longo do ano, favorecendo o crescimento vegetativo.

Além do grande aumento na área plantada, 30% do crescimento planejado para cana deverão ser provenientes de novas variedades e ganhos advindos no processo de moagem. Os híbridos modernos de cana-de-açúcar são caracterizados por alto grau de ploidia (SREENIVASAN; AHLOOWALIA; HEINZ, 1987), apresentando  $2n = 100$  a 130 cromossomos derivados da combinação de *Saccharum officinarum* (uma espécie rica em açúcares) e *Saccharum spontaneum* (um tipo selvagem e vigoroso) (BERDING; ROACH, 1987).

Normalmente, cana-de-açúcar forma associações simbióticas com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), em condições de campo. Sabe-se que os FMAs desempenham um papel importante na absorção e transporte de nutrientes do solo para planta (BOWEN; SKINNER; BEVEGE, 1974; HARLEY; BRIERLEY, 1954; TOBAR; AZCÓN; BAREA, 1994), e também

na diminuição de estresses provocados por fatores abióticos e bióticos, tais como: danos causados por metais pesados (NOGUEIRA, 1996; SIQUEIRA; POUYÚ; MOREIRA, 1999), por doenças (BODKER; KJOLLER; ROSENDAHL, 1998) e pelo estresse hídrico (NELSEN; SAFIR, 1982).

Com o intuito de compreender melhor o genoma da cana-de-açúcar, foi criado em 1998 o projeto SUCEST, gerando um banco de dados com 238.000 ESTs provenientes de 26 bibliotecas de cDNA (ARRUDA, 2001). As bibliotecas de cDNA foram construídas utilizando-se os principais órgãos e tecidos da cana-de-açúcar, colhidos em diferentes estágios de desenvolvimento. O sequenciamento foi feito pela terminação 5' dos clones unidirecionais de cDNA, visando abranger o máximo possível as seqüências de RNAm (VETTORE et al., 2001).

No Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da USP-ESALQ foram construídas 4 bibliotecas de cDNA, usando raízes de cana-de-açúcar colonizadas pelo fungo micorrízico *Glomus clarum*, gerando 1925 ESTs representando 1615 genes (TAKAHASHI, 2005). Mais de 40% destas EST não possuíam similaridade no banco SUCEST. O acúmulo destes transcritos em raízes micorrizadas sugere que mecanismos genéticos específicos são ativados durante a simbiose.

Os herbicidas Ametrina e Imazapique, pertencentes aos grupos das s-triazinas e imidazolinonas, respectivamente, podem ser aplicados na pré-emergência ou pós-emergência da cultura da cana-de-açúcar visando o manejo de plantas daninhas. Ambos são herbicidas seletivos para cultura da cana-de-açúcar (CHRISTOFFOLETI; OVEJERO; CARVALHO, 2004) e suas moléculas possuem propriedades físico-químicas que conferem uma persistência de três a seis meses, dependendo do clima e do solo (ALMEIDA; RODRIGUES, 1995). A Ametrina tem a capacidade de alterar os processos de transcrição e tradução em células aclorofiladas de cana-de-açúcar, *in vitro* (NEFTALI, 1983). O Imazapique, herbicida inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS) (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993), atua impedindo a síntese de aminoácidos ramificados essenciais ao desenvolvimento das plantas e dos microrganismos (VARGAS et al., 1999). Pouco se sabe sobre a influência destes herbicidas no desenvolvimento de MAs em cana-de-açúcar.

Determinar se a formação micorrízica em cana-de-açúcar ameniza os efeitos deletérios destes herbicidas e conhecer os efeitos destes herbicidas sobre a expressão de genes envolvidos no controle do desenvolvimento e eficiência de MAs é de grande relevância para a implantação de sistemas de manejo mais sustentáveis e de menor impacto a biota do solo.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito da Ametrina e do Imazapique na germinação de esporos de *G. clarum*, assim como na sua taxa de colonização. E determinar o efeito destes herbicidas no acúmulo de transcritos com expressão diferencial em raízes micorrizadas de cana-de-açúcar, utilizando hibridização em macroarranjos.

### Referências

ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N. **Guia de herbicidas**. 3.ed. Londrina: IAPAR, 1995. 675 p.

ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n. 1/4, [não paginado], 2001.

BERDING, N.; ROACH, B. T. Germplasm collection, maintenance, and use. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 211-253.

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

BOWEN, G. D.; SKINNER, M. F.; BEVEGE, D. I. Zinc uptake by mycorrhizal and uninfected roots of pinus-radiata and araucaria-cunninghamii. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 6, n.3, p. 141-144, 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio brasileiro: uma oportunidade de investimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 06 mar. 2006.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004. 100 p.

DEVINE, M.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. 441 p.

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

HARLEY, J. L.; BRIERLEY, J. K. The uptake of phosphate by excised mycorrhizal roots of the beech. vi. active transport of phosphorus from the fungal sheath into the host tissue. **New Phytologist**, New York, v. 53, n.2, p. 240-252, 1954.

NEFTALI, O. A. **Mecanismos de ação do Ametrina: Inibição do crescimento e inter-relação com os processos de transcrição e tradução em suspensões celulares de cana-de-açúcar**. 1983. 85 p. Tese (Doutorado no Instituto de Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

NELSEN, C. E.; SAFIR, G. R. Increased Drought Tolerance of Mycorrhizal Onion Plants Caused by Improved Phosphorus-Nutrition. **Planta**, New York, v. 154, n. 5, p. 407-413, 1982.

NOGUEIRA, A. V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras: UFLA, 1996. cap. 13, p. 135-174.

RODRIGUES, R. Século XXI, o novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 4-7, jan-jun. 2004.

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

SREENIVASAN, T. V.; AHLOOWALIA, B. S.; HEINZ, D. J. Cytogenetics. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 211-253.

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

TOBAR, R.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Improved nitrogen uptake and transport from N-15-labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. **New Phytologist**, New York, v. 126, n.1, p. 119-122, 1994.

VARGAS, L.; SILVA, A. A.; BORÉM, A.; REZENDE, S. T.; FERREIRA, F. A.; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Viçosa, MG: UFV. 1999. 131 p.

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

## 2 EFEITO DA AMETRINA E DO IMAZAPIQUE NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NO CRESCIMENTO INTRARRADICULAR DE *Glomus clarum* EM CANA-DE-AÇÚCAR

### Resumo

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) possuem notória importância tanto em ecossistemas naturais quanto agrícolas através do aumento da absorção de fósforo, nitrogênio e outros nutrientes do solo e sua transferência para a planta. A formação de micorrizas arbusculares (MAs) podem promover o crescimento de várias plantas, dentre elas a cana-de-açúcar. Assim fatores que restringem o desenvolvimento das MAs podem também restringir a produção das culturas agrícolas. Os efeitos do uso de práticas culturais que envolvam o controle químico de ervas daninhas sobre o desenvolvimento das MAs em cana-de-açúcar são ainda desconhecidos. O presente estudo teve por objetivo verificar o efeito dos herbicidas Ametrina e Imazapique sobre a germinação de esporo e na taxa de colonização intrarradicular por *Glomus clarum* em plantas de cana-de-açúcar. Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação com plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos com 3 Kg de latossolo vermelho-amarelo álico. O delineamento experimental usado foi o fatorial 2x2x4, com presença e ausência de *G. clarum*, com duas doses de fósforo (200 e 20 mg P Kg<sup>-1</sup> de substrato) e com três doses de herbicida mais o controle. O herbicida Ametrina não interferiu na germinação dos esporos ou mesmo na taxa de colonização intrarradicular por *G. clarum*. Já o uso do herbicida Imazapique promoveu uma diminuição na germinação dos esporos conforme se aumentava a concentração do herbicida. Efeito inverso foi observado na colonização intrarradicular, onde o aumento da concentração de Imazapique promoveu maiores taxas de colonização. Ambos herbicidas influenciaram negativamente a produção de biomassa seca da cana-de-açúcar. Embora tenha sido observado maior taxa de colonização intrarradicular em plantas tratadas com Imazapique, a presença do fungo parece não ter aliviado os efeitos deletérios promovidos pelo uso do herbicida nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** Micorriza arbuscular; germinação de esporos; colonização intrarradicular; arbúsculo; produção de biomassa seca; S-triazinas; Imidazolinonas; .

### Abstract

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMFs) play a key role in natural and agricultural ecosystems through major functions in the enhancement of plant phosphorus, nitrogen and other nutrients of the soil and their transference into the plants. The formation of arbuscular mycorrhizae (AM) may promote the growth of many plants, among them the sugarcane. Thus factors that restrict the AMs development can also limit the yield of others agriculture crops. The effects of the use of agriculture practices that involve the pesticide weed control on the AMs development in sugarcane is still unknown. The aim of the present work was to evaluate the effect of the Ametrine and Imazapic herbicide on the sugarcane plants inoculated with *Glomus clarum*. The experiments was carry out in the green house conditions with micro propagate

sugarcane plants fill with 3 Kg of typic haplorthox soil. The experiment delineate used was 2x2x4 factorial, with and without *G. clarum*, with two phosphorus concentration (200 e 20 mg P Kg<sup>-1</sup> of substrate) and with three herbicide concentration plus the control. The Ametrine herbicide do not interfered in the spores germination or even in the intraradical fungi colonization rates. Nevertheless the use of Imazapique herbicide promoted a reduction in the spores germination as enhanced Imazapic concentration. Converse effect was noted in the intraradical colonization rates, where the enhanced of Imazapic concentration promoted higher colonization rates. Both herbicide negatively influenced the dry biomass yield of sugarcane plants. Although the higher intraradical colonization rates has been observed in the Imazapic experiment, the presence of the fungi seems not alleviated the damage effect promoted by the use of the pesticide in these studies conditions.

**Keywords:** Arbuscular mycorrhizae; spores germination; arbuscule; intraradical colonization; dry biomass yield; S-triazines; Imidazolinones.

## 2.1 Introdução

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas que ocorre entre os fungos da ordem Glomales e as raízes de cerca de 80% das espécies vegetais. Os benefícios das micorrizas se aplicam ao aumento de produção agrícola em solos marginais, a diminuição do uso de insumos químicos e a redução dos efeitos de fatores edáficos estressantes, contribuindo assim para uso de uma agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos.

A preocupação com o aquecimento global tem levado autoridades no mundo inteiro a adotar políticas que estimulem o uso de fontes renováveis de energia. A sociedade como um todo também tem pressionado seus governantes a incentivarem o uso de tecnologias que envolvam o seqüestro de carbono, ao invés do seu desprendimento. Atendendo essas exigências, a cultura da cana-de-açúcar tem se destacado por servir de fonte de energia alternativa aos petroquímicos e por ser capaz de retornar ao solo boa parte do carbono emitido pela queima dos derivados de petróleo. Dessa forma, a cultura da cana-de-açúcar se encontra em franca expansão, necessitando de práticas culturais mais sustentáveis e de menor custo ambiental.

Dentre as práticas culturais mais agressivas ao meio ambiente se encontra a aplicação de herbicida sobre o solo. Ametrina e Imazapique são herbicidas usados no controle de plantas invasoras em inúmeras culturas, tanto em pré como pós-emergência. Na cultura de cana-de-açúcar a Ametrina é o segundo herbicida mais usado, depois das uréias substituídas. Imazapique é menos usado que a Ametrina, porém ambos são usados no controle de folhas largas e estreitas. Ametrina, herbicida do grupo das s-triazinas, atua inibindo a fotossínteses em tecidos



clorofilados. Já Imazapique, herbicida do grupo das imidazolinonas, atua inibindo a síntese de acetolactato, precursor dos aminoácidos essenciais: leucina, isoleucina e valina.

Tem sido observado que as MAs são capazes de aliviar os efeitos fitotóxicos provocados pelo uso de herbicidas, porém, o envolvimento dos FMAs como potenciais aliviadores dos efeitos depressivos do uso de herbicidas na cultura da cana-de-açúcar não foi investigado. O presente trabalho descreveu, a) o efeito da Ametrina e Imazapique na germinação de esporos de *G. clarum*, b) o efeito destes herbicidas na taxa de colonização micorrízica intrarradicular e c) o efeito associado da inoculação de FMA com a fitotoxicidade causada pelo uso destes dois herbicidas, no ganho de matéria seca e no volume das raízes.

## **2.2 Revisão bibliográfica**

### **2.2.1 Cana-de-açúcar**

Considerada uma das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (LUCCHESI, 1995), a cultura da cana-de-açúcar representa hoje 5,495 milhões de hectares em área colhida, com produção no ano 2005/2006 de 423 milhões de toneladas de colmos (FNP CONSULTORIA e COMÉRCIO, 2006). A agroindústria da cana-de-açúcar exerce uma forte influência sócio-econômica, sendo a maior geradora de empregos diretos e indiretos, além de gerar valores econômicos e culturais consideráveis (RODRIGUES, 2004). Tamanha riqueza gerada se deve em parte à sua grande amplitude de utilização, sendo empregada como matéria-prima na produção de açúcar e álcool anidro, na fabricação de rapadura, melado, aguardente e fertilizantes, na produção de energia e papel à partir do bagaço, na alimentação animal como forragem ou na complementação de ração animal à partir da vinhaça (LUCCHESI, 1995).

Com uma das taxas mais eficientes na transformação de nutriente em matéria-verde por período de tempo, a cana-de-açúcar depende de solos férteis cujo esgotamento se torna pronunciado quando cultivada na forma de monocultura (FERNANDES, 1984). A cultura requer P em menores quantidades do que N e K, porém em solos tropicais e subtropicais a maior parte do P do solo se encontra em formas pouco disponíveis para as plantas, fator este que limita a produtividade agrícola.

### 2.2.2 Fungo micorrízico arbuscular

O termo micorriza vem do grego, *mykes* = (fungos) e *rhiza* = (raiz), e foi empregado pela primeira vez por Frank em 1885 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002) para se referir às associações simbióticas mutualísticas que ocorrem entre os fungos e as raízes das plantas. Dentre os diferentes tipos de micorrizas, as arbusculares são as mais frequentes, pois ocorrem em cerca de 80% das plantas vasculares (GINZBERG; DAVID; SHAUL, 1998). As MAs são formadas pelas associações de raízes com fungos da ordem Glomales, essa simbiose é caracterizada pela formação no interior das células do córtex de uma estrutura fúngica dicotômica denominada arbúsculo, responsável pela troca de nutrientes entre o fungo e a planta (BONFANTE-FASOLO; PEROTTO, 1991; 1992).

Os FMAs são simbiotróficos obrigatórios, pois completam seu ciclo de vida apenas se estiverem associados a uma planta hospedeira, a qual lhes fornece carboidratos e outros fatores necessários ao seu desenvolvimento e esporulação (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002). Não há evidências de especificidade hospedeira e não ocorrem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas. A presença da associação é apenas detectada através de observações microscópicas de raízes clarificadas e coloridas com corantes especiais.

As MAs podem exercer enorme efeito sobre a fisiologia das plantas, entre os benefícios estão a maior absorção de fósforo, nitrogênio e outros nutrientes do solo (EZETA; SANTOS, 1980; SILVEIRA, 1992), a melhor adaptação de plântulas micropropagadas (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1997), o aumento da resistência à doenças (BODKER; KJOLLER; ROSENDAHL, 1998), a diminuição dos estresses causados por fatores diversos, como metais pesados (DAVIES et al., 2001) e estresse hídrico (AUGÉ, 2001). Além disso, os FMAs podem contribuir para a agregação das partículas do solo, produzindo uma glicoproteína chamada glomalina (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996). As MAs atuam também como bioreguladores, estimulando a produção e acúmulo de substâncias reguladoras do crescimento (desenvolvimento e floração) e no acúmulo de certos metabólicos secundários (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002).

São poucos os estudos avaliando os efeitos benéficos das MAs na cultura da cana-de-açúcar, provavelmente em virtude da baixa dependência micotrófica desta espécie vegetal (SIQUEIRA; FRANCO, 1988), no entanto, Takahashi, Matsuoka e Meneghin (1998) estudando os efeitos dos FMAs em cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação, usando dois tipos de

solo (mata e sob cana-de-açúcar), observaram um maior nível de colonização radicular e aumento no crescimento vegetativo das plantas cultivadas em solo proveniente da mata quando comparado com solo sob cana-de-açúcar.

### 2.2.3 Ametrina

No início da década de 50 um grupo de pesquisadores da J. R. Geigy Ltd. iniciaram suas investigações com derivados de triazinas para uso como potenciais herbicidas (ASHTON; CRAFTS, 1973). A ação seletiva que estes herbicidas exerciam na cultura do milho e seu eficiente controle das ervas-daninhas, comparado aos herbicidas existentes na época, fizeram das triazinas o herbicida aplicado ao solo mais usado nas décadas subsequentes (DUBACH, 1970).

Dos herbicidas do grupo das s-triazinas, a Ametrina (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metil-s-2,4,6-triazina) é o mais utilizado. Normalmente esse herbicida atua nas membranas do cloroplasto, durante a fase luminosa da fotossíntese (ESSER, 1975), acoplando-se a  $PQ_B$  do fotossistema II, bloqueando o transporte de elétrons para o citocromo *bf* e a produção NADPH (CARVALHO, 2004; Figura 1).

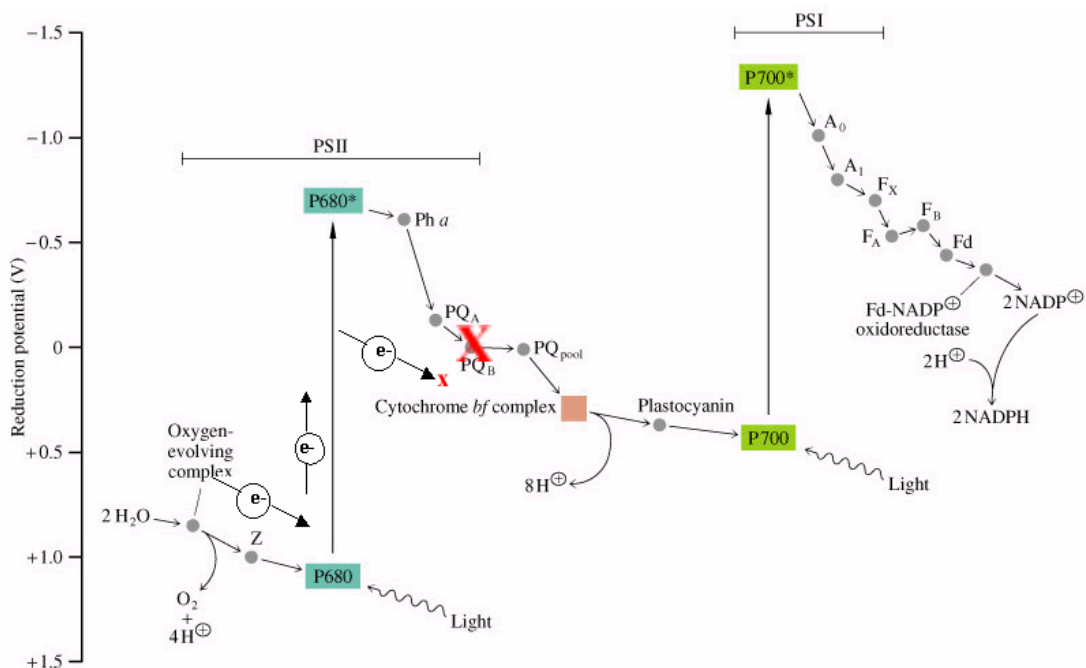


Figura 1 – Transporte de elétrons (esquema Z) acoplado com as reações fotoquímicas da fotossíntese (adaptado de Horton et al., 2002)

A molécula da Ametrina, na prática é usada somente nas culturas de cana-de-açúcar e de abacaxi (GAST, 1970). Sua seletividade à cultura de cana-de-açúcar é dada pela reação de degradação oxidativa como a N-dealquilação (GOSHWAMI, 1972 apud KEARNEY; KAUFMAN, 1975), resultando em metabólicos transientes que são menos fitotóxicos e se tornam substratos para degradação subsequente.

Suas propriedades físico-químicas conferem a Ametrina longo tempo de controle das ervas podendo persistir por até seis meses no solo (ALMEIDA; RODRIGUES, 1995). Experimentos conduzidos na década de 60 por diferentes autores demonstram que a triazina quando usada até em doses elevadas não promovia a diminuição da atividade biológica no solo, medida pela liberação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ao longo do tempo (KAISER; POCHON; CASSINI, 1970). Entretanto estes herbicidas têm sido apontados como possíveis agentes causadores de disfunções endócrinas em sapos, resultando na crescente diminuição deste organismo no meio agrícola (REEDER et al., 2005). Hecker et al. (2004) encontraram correlação negativa entre os esteróides testosterona e estradiol com o uso de atrazina no campo em machos e fêmeas de sapo, respectivamente.

O efeito das triazinas sobre a microflora é controverso. Alguns autores registram a influência deste grupo de herbicida estimulando a atividade dos FMAs no solo, outros inibindo, porém todos concordam no estabelecimento da normalidade original depois de um curto ou longo período de tempo (TRAPPE; MOLINA; CASTELLANO, 1984).

Uhlig (1966) relata o efeito de quatro anos de aplicação de Cimazine, outro herbicida do grupo das s-triazinas, em plantas de pinus sobre a taxa de colonização micorrízica. O autor concluiu que a micorrização foi estimulada em raízes com alta taxa de colonização e inibida em raízes com baixa taxa de colonização, independente da dose utilizada do herbicida. Em *Citrus* spp. Cimazine inibiu o crescimento e a formação de MAs (NEMEC; TUCKER, 1983). Já na cultura de maçã a aplicação de Cimazine não afetou a colonização por *Glomus versiforme*, porém reduziu em raízes micorrizadas a produção de biomassa seca das raízes quando comparado às raízes não micorrizadas (HAMEL et al., 1994).

#### **2.2.4 Imazapique**

O herbicida Imazapique, ácido 2-[4,5-dihidro-4-metil-(1-metiletil)-5-oxo-1H-imidazol-2-il-5-metil-3] piridina carboxílico, pertence ao grupo químico das imidazolinonas. Estes

herbicidas ligam-se fortemente à enzima acetolactato sintase (ALS - EC 2.2.1.6), dificultando o acesso ao seu sítio ativo (PANG; GUDDAT; DUGGLEBY, 2003), resultando em uma inibição não-competitiva (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Esses herbicidas foram introduzidos no Brasil em 1986, visando o controle de plantas daninhas dicotiledôneas na cultura da soja. Os herbicidas desta classe determinaram o início de uma nova geração de herbicidas a serem usados na agricultura (LEITE; ALMEIDA; PRETE, 1998).

ALS é a primeira enzima na via biossintética dos aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina (figura 2). Essa enzima condensa duas moléculas de piruvato para formar 2-acetoglutarato, que é o precursor da leucina e valina. Essa mesma enzima também pode fazer a mesma reação com piruvato e 2-cetobutarato formando 2-acetohidroxibutarato, que por sua vez é precursor da isoleucina (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Sua ação ocorre nos plastídeos.

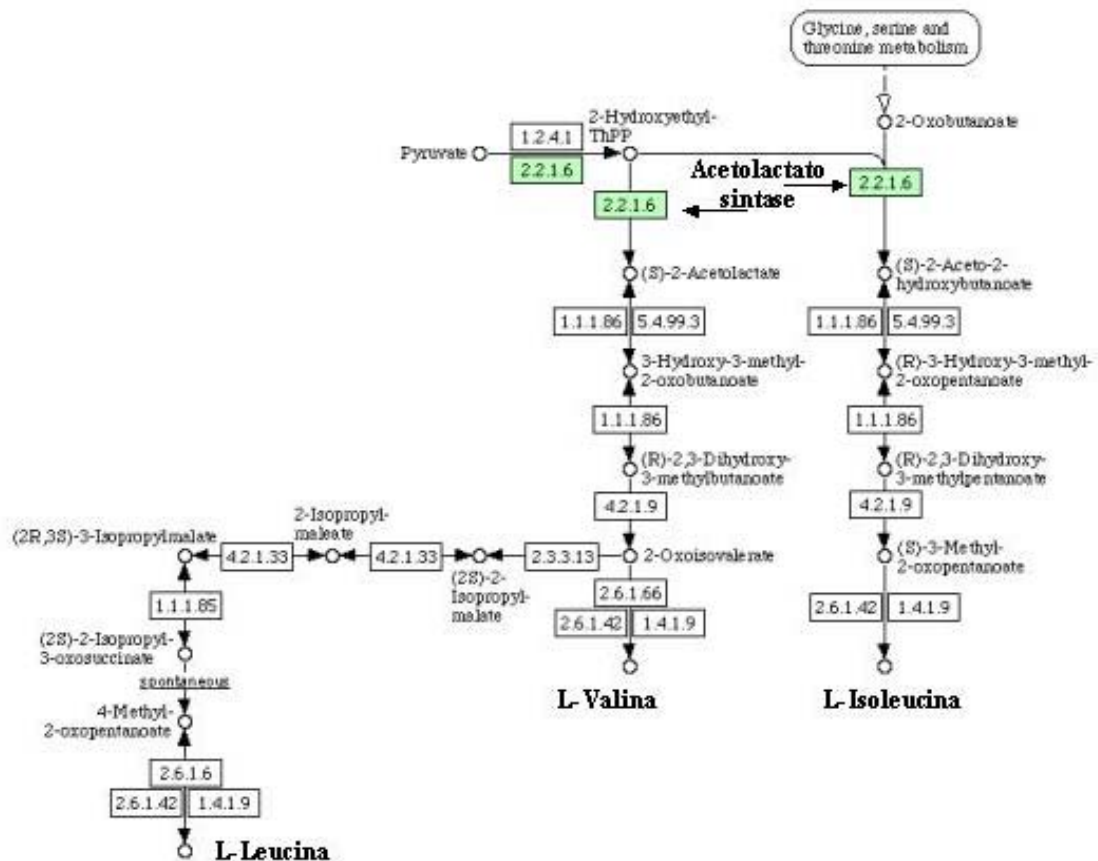


Figura 2 – Rota da biossíntese de Isoleucina, Valina e Leucina. Adaptado do KEGG PATHWAY Database

A paralisação na síntese dos aminoácidos leva a uma interrupção na divisão celular e paralisação do crescimento (KISSMANN, 2006). Herbicidas dessa classe são no geral transportados no xilema e floema, podendo ser absorvidos e translocados a partir das folhas ou das raízes (KISSMANN, 2006).

O aumento do uso dos herbicidas desta classe se deve à sua baixa toxicidade aos animais, uma vez que estes não sintetizam Leucina, Isoleucina e Valina; ao amplo espectro de atuação sobre as diferentes ervas daninhas; e a eficiência de aplicação em baixas dosagens, em média em torno de 200g ha<sup>-1</sup> (TAN; EVANS; DAHMER, 2005).

A destoxificação das imidazolinonas é o principal mecanismo de seletividade das plantas tolerantes. A degradação do ingrediente ativo ocorre pela hidroxilação do grupo aquiril e/ou destruição do anel imidazolinona (LEITE; ALMEIDA; PRETE, 1998). Além do mecanismo de destoxificação, alguns biótipos de ervas daninhas têm se tornado resistente as imidazolinonas devido a mutação do gene ALS, tornando-a insensível ao princípio ativo. As mutações mais frequentes ocorrem na posição 122 da Alanina, 197 da Prolina, 205 da Alanina, 574 do Triptofano e 653 da serina. (TAN; EVANS; DAHMER, 2005).

As imidazolinonas são capazes de alterar o metabolismo não só de plantas como também de microrganismos que sintetizam a valina, leucina e isoleucina. Siqueira, Safir e Nair (1991) estudando o efeito de duas imidazolinonas em plantas de sorgo micorrizadas, verificaram que Imazaquim não alterava a taxa de colonização por *G. intraradices*, porém nas duas maiores concentrações de Imazapir ocorreu uma diminuição na taxa de colonização radicular. Os mesmo autores não observaram efeito residual destes herbicidas sobre a colonização micorrízica em milho. Neste mesmo trabalho os autores demonstram que as plantas micorrizadas são capazes de aliviar os efeitos depressivos do herbicida sobre as plantas.

Não foram encontrados relatos de Imidazolinonas afetando a germinação de esporos ou mesmo o crescimento do tubo germinativo, mas provavelmente o metabolismo do fungo deve ser alterado devido a natureza de ação do herbicida.

## **2.3 Material e métodos**

### **2.3.1 Germinação de esporos**

O método de obtenção de esporos foi descrito por Gerdemann e Nicolson (1963). Resumidamente, 50g de solo proveniente de vasos com plantas multiplicadoras (*Brachiaria decumbens*) foram lavados e passados em peneiras de 71 e 38 $\mu$ m. Os esporos de *G. clarum* retidos na peneira de 38 $\mu$ m foram separados por centrifugação em solução de sacarose e lavados com água destilada em abundância.

O experimento para determinação da porcentagem de germinação de esporos foi feito conforme descrito por Lambais (1987), com modificações. Em resumo, usando um microscópio estereoscópico (LEICA), os esporos foram separados em grupos de 30 e transferidos para membranas filtrantes com 0,2 $\mu$ m de porosidade e 47mm de diâmetro, as quais posteriormente foram dobradas (forma de funil achatado) e colocadas entre duas camadas de solo autoclavado separadas por telas de náilon de 0,45 $\mu$ m de malha, dentro de placas de Petri descartáveis, contendo 50g de solo seco. Após a montagem do envelope os herbicidas foram aplicados sobre o solo nas concentrações estudadas. No tratamento controle foi aplicado água destilada esterilizada. Foram feitas cinco repetições para cada tratamento.

A umidade do solo foi mantida a 70% da capacidade máxima de retenção de água. As amostras foram mantidas em sala aclimatizadas à 37°C no escuro por uma semana. Após este período, foram feitas contagens do número de esporos germinados e não germinados, usando tripan-blue para colorir as hifas.

### **2.3.2 Quantificação da colonização intrarradicular**

Foram coletadas alíquotas do terço médio do sistema radicular para quantificação da colonização intrarradicular pelo fungo. As raízes foram armazenadas em etanol 70%. O conteúdo citoplasmático foi removido com KOH 10% por 60 min à 90°C, e as raízes foram coradas com tinta de caneta Parker® à 5% (v/v) em solução de ácido acético, à 90°C por 3 minutos, lavadas em ácido acético à 5% (v/v), e armazenadas em lacto-glicerol (VIERHEILIG et al., 1998). Utilizando-se um microscópio estereoscópico (aumento de 45 vezes) e placas reticuladas foi determinada a taxa de colonização pela presença de estruturas fúngicas (esporos, vesículas, arbúsculos e hifas) no tecido cortical, de acordo com Giovanetti e Mosse (1980).

### 2.3.3 Ensaios em casa-de-vegetação

Foram realizados dois ensaios para determinar o efeito de Ametrina e Imazapique em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Ciência do Solo da ESALQ-USP, (Piracicaba, SP). Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) var. SP 80-3280, obtidas do Centro de Tecnologia Canavieira – CTC (Piracicaba, SP) foram plantadas em bandejas de isopor (200 células) contendo substrato composto por areia:vermiculita (2:1, vol/vol). Após aclimatação por um período de dez dias as plântulas foram transplantadas para vasos de polietileno escuro, contendo 3kg de solo latossolo vermelho-amarelo álico, A moderado, textura média, unidade laranja azeda (OLIVEIRA; PRADO, 1989), fase cerrado, esterilizado e coletado na camada superficial (0-20cm) no distrito de Artemis, Piracicaba – SP.

Ainda por ocasião do transplântio, as plântulas foram inoculadas com *G. clarum*. O inóculo constituiu de 50g de solo contendo esporos, hifas e fragmentos de raízes de milho (*Zea mays* L.) colonizadas pelo fungo, de forma a obter 300 esporos  $\text{kg}^{-1}$  de solo. Como controle, foi utilizado solo contendo raízes de milho não colonizadas pelo fungo. Um dia após o transplântio, o solo foi adubado com 210mg N na forma de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , dividido em três aplicações a cada 20 dias), em torno de 250mg de K na forma de fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) e cloreto de potássio (KCl), 200mg de Ca na forma de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), 73mg de Mg na forma de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 1mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1mL de solução de micronutrientes de Hoagland  $\text{kg}^{-1}$  de solo, de acordo com Sarruge (1975). A adubação fosfatada foi feita com 20 ou 200mg de P  $\text{kg}^{-1}$  de solo na forma de fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), representando baixo fósforo (BP) e alto fósforo (AP), respectivamente.

A aplicação dos herbicidas foi realizada quatro semanas após o transplântio, quando as plantas apresentavam 2 folhas. O herbicida Ametrina foi aplicado sobre o solo nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6g de i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de solo, já o herbicida Imazapique foi aplicado sobre o solo nas concentrações de 15,4; 30,8 e 61,6mg de i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de solo, representando 0,5x; 1x e 2x a dose recomendada para a cultura da cana-de-açúcar em solo arenoso. As soluções de herbicidas foram obtidas por diluição seriada usando água destilada esterilizada. Plantas que não receberam herbicidas foram usadas como controle.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x4 com 5 repetições, sendo dois níveis de inoculação (inoculado com *G. clarum* e não-



inoculado), dois níveis de adubação fosfatada (20 e 200mg kg<sup>-1</sup>), e quatro concentrações de herbicidas (sem herbicida, 0,5x, 1x e 2x a dose recomendada) perfazendo um total de 80 unidades experimentais, para cada ensaio.

#### **2.3.4 Determinação da biomassa seca de raiz e da parte aérea**

Para determinação da biomassa seca das raízes, a mesma foi separada da parte aérea. Após determinar a massa fresca das raízes na ocasião da colheita, alíquotas foram retiradas para quantificação da área e comprimento das raízes e para determinação da colonização radicular. As raízes foram colocadas secas em estufa de fluxo forçado à 65°C até atingir massa constante. A biomassa seca total das raízes foi determinada pelo somatório da biomassa seca das raízes recolhidas da estufa com o peso fresco das alíquotas retiradas subtraído do teor de água medido em base úmida.

Para determinação da biomassa seca da parte aérea, a mesma foi seca em estufa de fluxo forçado à 65 °C até atingir massa constante.

#### **2.3.5 Quantificação da área superficial e do comprimento das raízes**

Alíquotas de 20% da massa fresca das raízes foram removidas e armazenadas em etanol 70% até o processamento das amostras. A aquisição de imagem das raízes foi feita sobre um transiluminador, usando câmera digital Nikon EOS50. As imagens foram editadas no programa Corel PHOTO-PAINT (v. 7.468) e processadas no programa SIARCS 3.0 para obtenção da área (cm<sup>2</sup>) e comprimento (cm) das raízes de acordo com Jorge e Crestana (1996).

### **2.4 Resultados**

#### **2.4.1 Germinação de esporos em solos tratados com Ametrina**

A taxa de germinação dos esporos em solos que receberam Ametrina não diferiu estatisticamente daquelas observadas em solos sem herbicida ( $p < 0,05$  – figura 3).

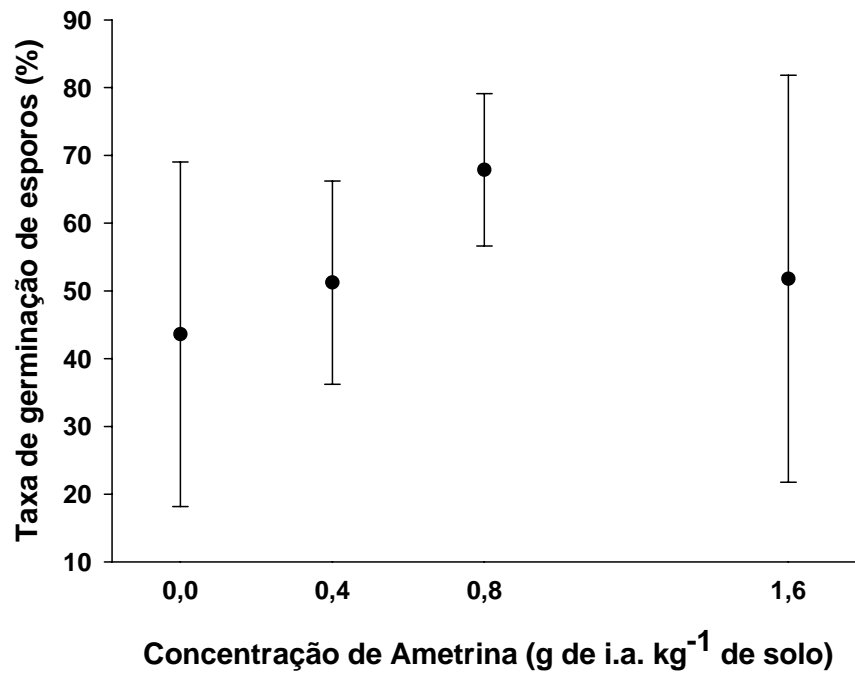


Figura 3 – Germinação de esporos de *G. clarum* em solos tratados com Ametrina. Dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

#### 2.4.2 Taxa de colonização intrarradicular em cana-de-açúcar tratada com Ametrina

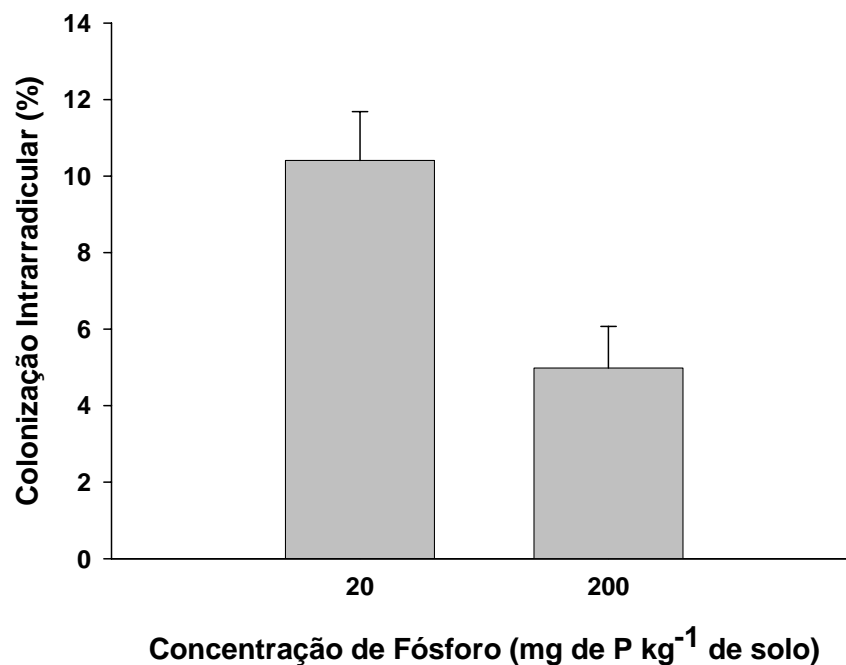


Figura 4 – Colonização intrarradicular de cana-de-açúcar por *Glomus clarum* em plantas cultivada em solo com 20 (BP) e 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup>. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

A taxa de colonização por *G. clarum* foi dependente da concentração de P no solo e independente da concentração de Ametrina utilizada (figura 4). As plantas não-inoculadas não apresentaram colonização micorrízica. As plantas cultivadas em BP apresentaram colonização intrarradicular 2 vezes maior do que as plantas cultivadas em AP.

### 2.4.3 Produção de biomassa seca das raízes

A produção de biomassa seca das raízes foi dependente da concentração do herbicida no solo e da concentração de P em que as plantas foram cultivadas, porém independente da presença do FMA. O uso da Ametrina nas concentrações estudadas promoveu uma depressão na produção de biomassa seca das raízes em relação às plantas que não receberam o herbicida (figura 5). Plantas cultivadas em AP e em solo sem Ametrina apresentaram maior produção de biomassa seca de raízes quando comparadas às plantas cultivadas em AP e que receberam a dose recomendada de Ametrina (0,8g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) ou o dobro dessa dose (1.6g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo). As plantas cultivadas em AP e que não foram tratadas com o herbicida apresentaram maior produção de matéria secas das raízes quando comparadas às plantas cultivadas em BP e que receberam herbicida, independente da concentração.

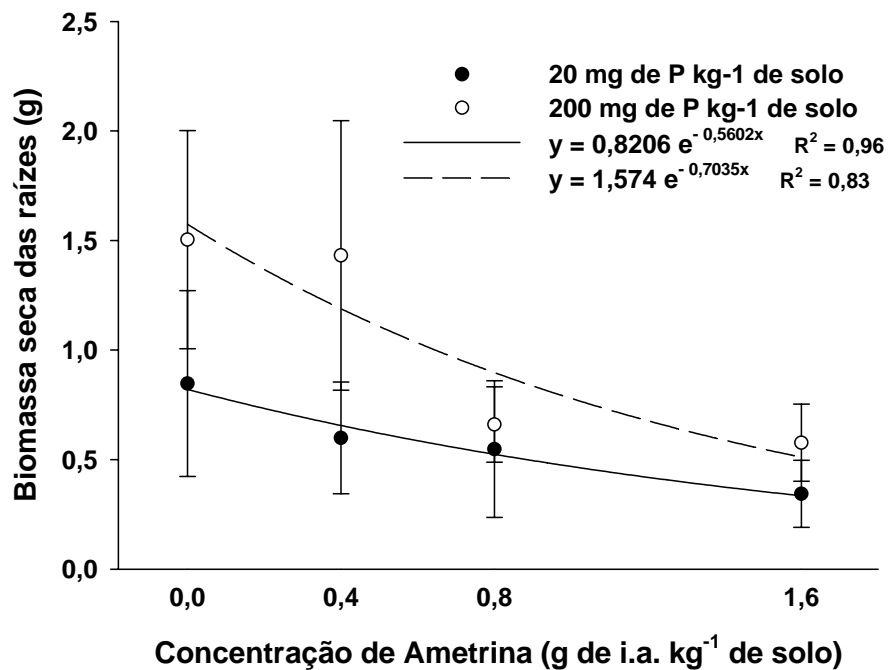


Figura 5 – Variação da biomassa seca das raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Ametrina. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

Não houve diferença significativa na produção de biomassa seca das raízes entre as plantas cultivadas com herbicida em condições de BP.

Nas condições avaliadas, as plantas cultivadas em condições de AP e na presença da maior dose de Ametrina (1,6g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) apresentaram redução em torno de 60% na produção de biomassa seca das raízes quando comparadas às plantas não tratadas.

#### 2.4.4 Área e comprimento das raízes

A área superficial e comprimento das raízes seguiram sempre a mesma tendência, sendo aqui expressos somente os valores da área superficial das raízes. A área superficial das raízes foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelas interações da concentração do herbicida com a concentração de P no solo (figura 6) e da concentração de P no solo com presença do inóculo (figura 7).

Plantas cultivadas em AP e em solo sem Ametrina apresentaram maior área superficial de raízes do que as plantas cultivadas em AP e que receberam a dose superior a 0,4g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo. As plantas cultivadas em AP apresentaram maior área superficial de raízes quando comparadas às plantas cultivadas em BP, independente da concentração de Ametrina.

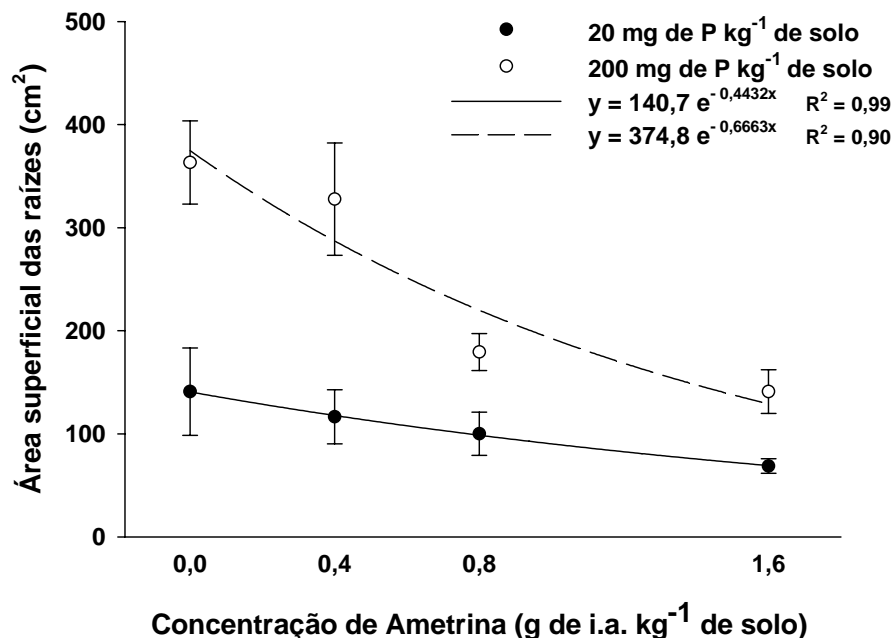


Figura 6 – Variação da área superficial das raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Ametrina. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

As plantas cultivadas em BP e em solos tratados com a maior concentração de Ametrina (1,6g de i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de solo) apresentaram a menor área superficial das raízes quando comparada aos demais tratamentos. O uso do herbicida Ametrina promoveu a redução da área superficial das raízes de cana-de-açúcar em 2 vezes quando as plantas foram cultivadas em solo tratado com a dose recomendada de Ametrina (0,8g de i.a.  $\text{kg}^{-1}$  de solo) ou o dobro desta dose em condições de AP e BP, respectivamente.

As plantas cultivadas em AP apresentaram maior área superficial de raízes quando comparadas às plantas cultivadas em BP, independente da presença de *G. clarum*. Não houve efeito significativo da inoculação sobre a área superficial das raízes nas plantas cultivadas em AP ( $p < 0,05$ ). Porém, as plantas micorrizadas cultivadas em BP apresentaram aumento de 112% na área superficial das raízes quando comparadas às plantas não micorrizadas, nas mesmas condições de P.

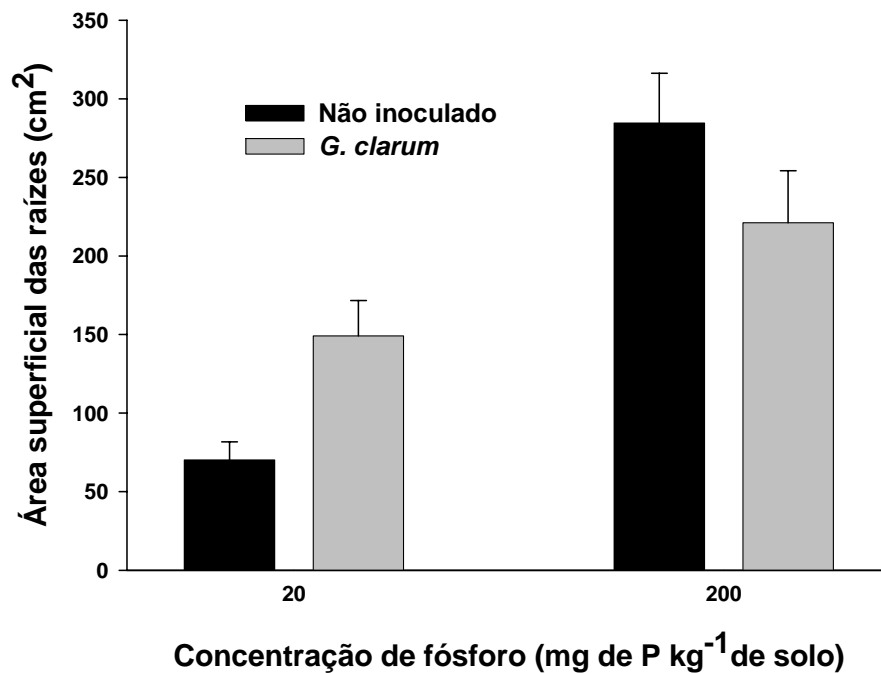


Figura 7 – Área superficial das raízes de cana-de-açúcar inoculadas ou não com *Glomus clarum* e cultivadas em solo com 20 (BP) e 200 (AP)  $\text{mg P kg}^{-1}$ . Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

### 2.4.5 Produção de biomassa seca da parte aérea

A produção de biomassa seca da parte aérea foi dependente de duas duplas interações envolvendo a concentração de P no solo com a concentração de Ametrina e com a presença do FMA.

As plantas cultivadas em AP apresentaram maior produção de biomassa seca da parte aérea quando comparadas às plantas cultivadas em BP, independente da concentração de Ametrina utilizada (figura 8).

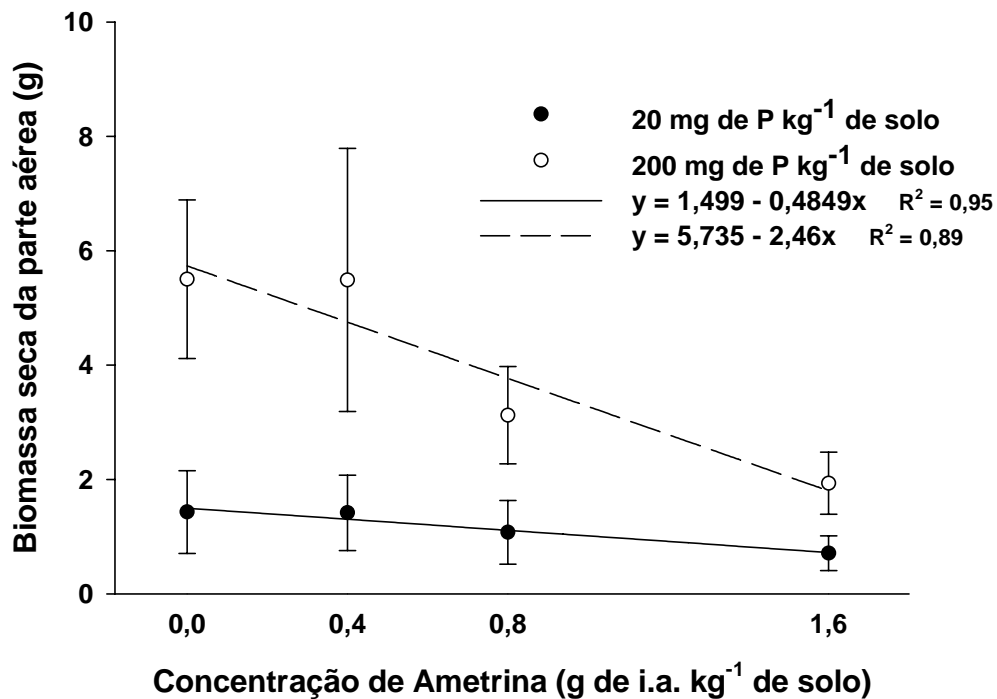


Figura 8 – Variação da biomassa seca da parte aérea de cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Ametrina. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

Plantas cultivadas em AP e em solo sem Ametrina tiveram maior produção de biomassa seca da parte aérea quando comparadas às plantas cultivadas em solo tratado com dose maior que 0,8g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo. Nas plantas cultivadas em AP e que receberam metade da dose recomendada para o campo (0,4g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo), a produção de biomassa seca da parte aérea não diferiu estatisticamente do controle sem herbicida ( $p < 0,05$ ). As plantas cultivadas em solo tratado com a maior dose de Ametrina (1,6g de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) tiveram redução de 65% na produção de biomassa seca da parte aérea quando comparadas às plantas cultivadas em solo

herbicida. Em condições de BP, a produção de biomassa seca da parte aérea não foi significativamente afetada pela aplicação de Ametrina ( $p < 0,05$ ).

As plantas cultivadas em AP quando comparadas às plantas cultivadas em BP, apresentaram maior produção de biomassa seca da parte aérea, independentemente da presença de *G. clarum* (figura 9).

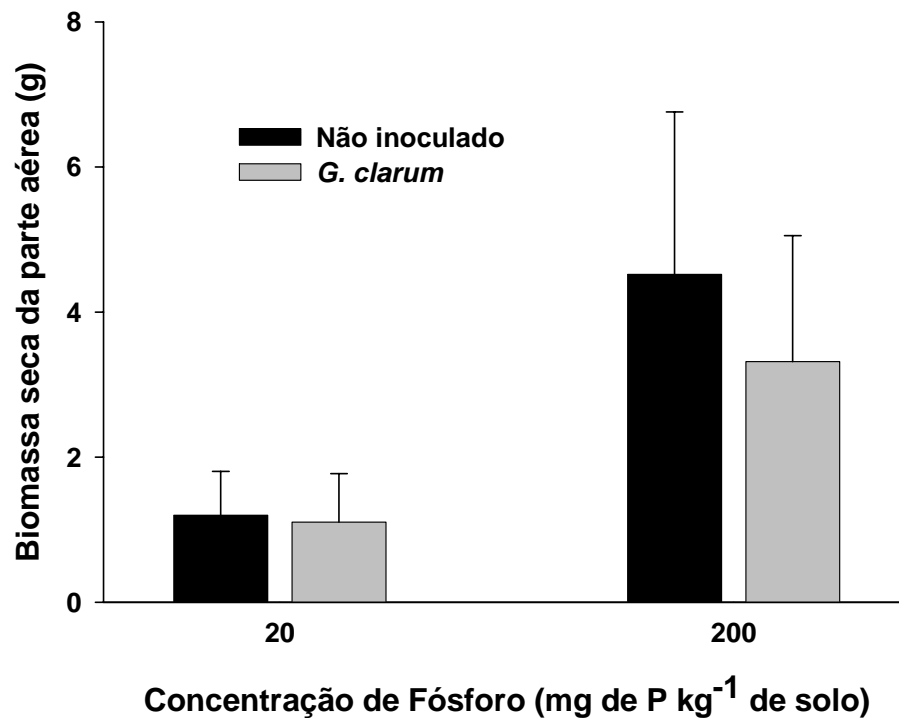


Figura 9 – Produção de biomassa seca da parte aérea de cana-de-açúcar inoculado ou não com *Glomus clarum* e cultivada em solo com 20 (BP) e 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup>. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

As plantas cultivadas em AP e na ausência do inóculo apresentaram aumento de 276 e 308% na produção de biomassa seca da parte aérea quando comparadas às plantas cultivadas em BP na presença ou ausência do inóculo, respectivamente. Já as plantas cultivadas em AP inoculadas com *G. clarum* não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das plantas cultivadas em BP, independente da presença ou ausência do inóculo.

### 2.4.6 Germinação de esporos em solos tratados com Imazapique

A taxa de germinação de esporos foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pela concentração do herbicida. Em solos que não receberam Imazapique ao número de esporos germinados foi maior que em solos tratados com Imazapique, independente da dose. O aumento da dose de Imazapique promoveu uma diminuição no número de esporos germinados (figura 10).

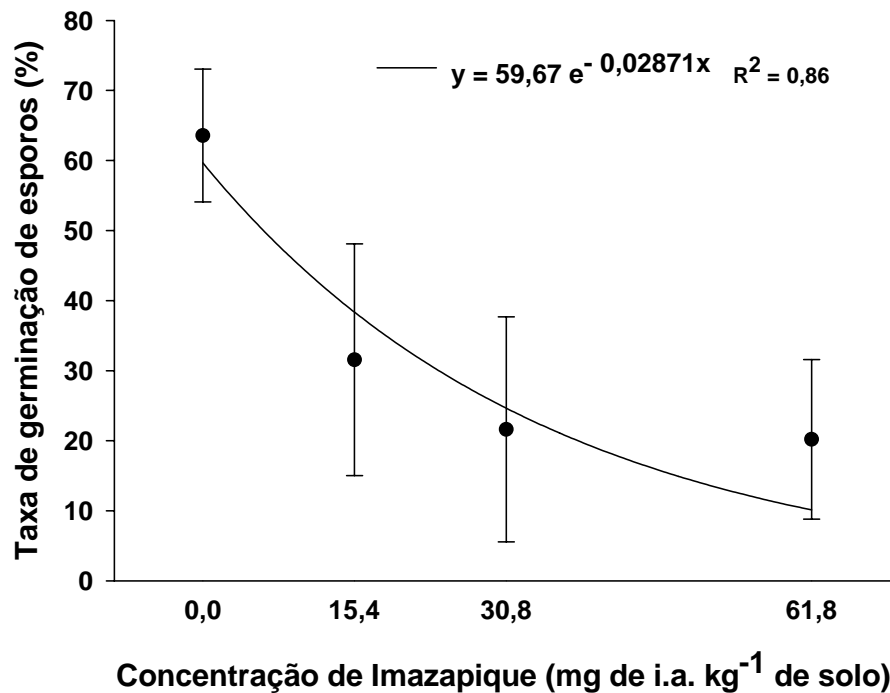


Figura 10 – Variação na germinação de esporos de *Glomus clarum* em solos tratadas com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

Solos tratados com a maior dose de Imazapique (61,8mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) apresentaram redução de 74% na germinação de esporos quando comparados aos solos sem herbicida. Em solos que receberam a menor dose de Imazapique (0,5x a dose recomendada), a germinação de esporos foi reduzida 2 vezes em relação ao controle sem herbicida ( $p < 0,05$ ).

### 2.4.7 Taxa de colonização intrarradicular em cana-de-açúcar tratada com Imazapique

A taxa de colonização e a freqüência no número de esporos intrarradiculares de *G. clarum* foram dependentes da concentração do herbicida e da concentração de P em que as plantas foram



cultivadas (figura 11 e 12, respectivamente). As plantas não-inoculadas não apresentaram colonização micorrízica.

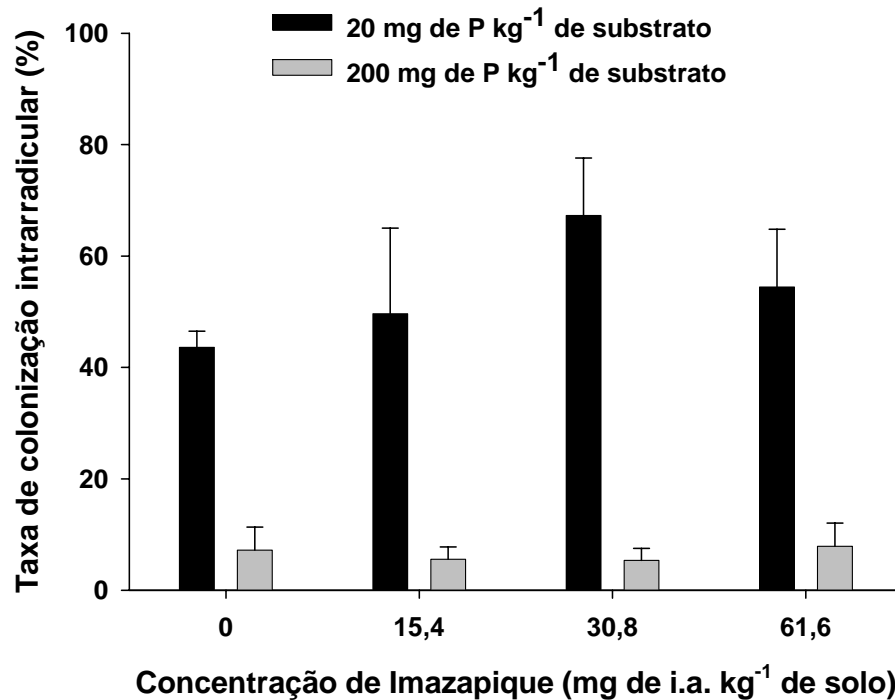


Figura 11 – Colonização intrarradicular por *Glomus clarum* em cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

As plantas cultivadas em AP apresentaram porcentagem de colonização intrarradicular menor do que as plantas cultivadas em BP. As plantas cultivadas em BP e que receberam dose integral de Imazapique (30,8mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) apresentaram maior colonização intrarradicular do que as plantas não tratadas com o herbicida. Já, as plantas cultivadas em BP e em solo tratado com 0,5 e 2x a dose recomendada de Imazapique não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das plantas cultivadas na mesma condição e em solos sem herbicida ou com a dose recomendada de Imazapique. Não houve efeito significativo do herbicida ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de colonização intrarradicular nas plantas cultivadas em AP.

As plantas cultivadas em BP e em solo tratado com a dose integral recomendada para o campo (30,8 mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) tiveram aumento de 54% na taxa de colonização intrarradicular quando comparadas às plantas cultivadas sem herbicida.

Nas plantas cultivadas em BP e que receberam a maior dose de Imazapique (61,6mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) a frequência no número de esporos intrarradiculares foi maior ( $p<0,05$ ) do que as plantas sem herbicida ou que receberam metade da dose recomendada (15,4mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo). Nas plantas cultivadas em solo tratado com a maior dose de Imazapique a frequência no número de esporos intrarradiculares foi 5 vezes maior do que em plantas cultivadas sem herbicida. Não houve efeito significativo ( $p<0,05$ ) do Imazapique na frequência do número de esporos intrarradiculares nas plantas cultivadas em AP.

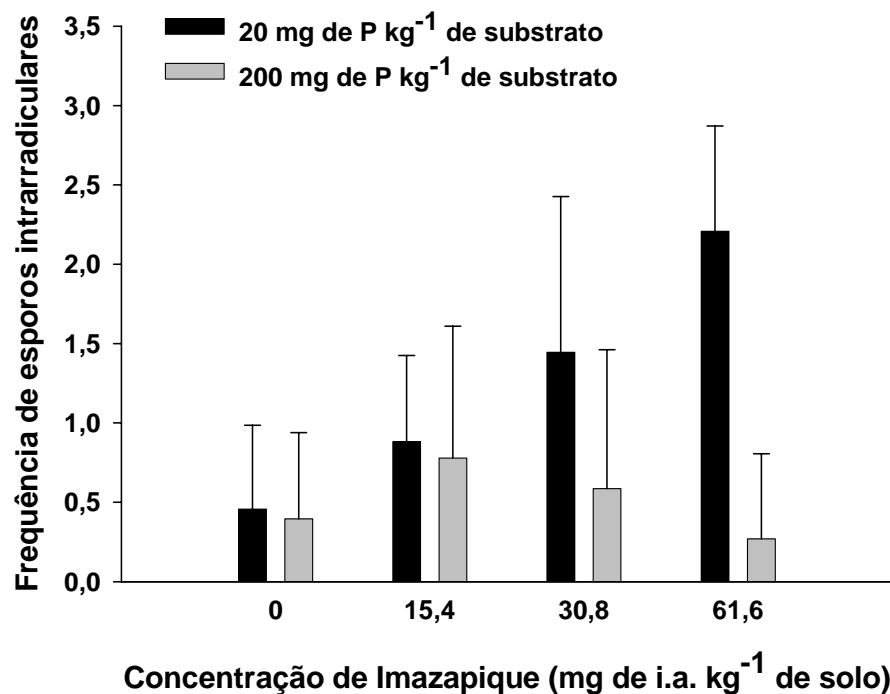


Figura 12 – Frequência de esporos intrarradiculares de *Glomus clarum* encontrados em cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

O efeito do herbicida Imazapique na frequência do número de arbúsculo e de hifa intrarradicular não variou significativamente com a aplicação do herbicida no solo, mas foi significativamente afetada ( $p<0,05$ ) pela concentração de fósforo em que as plantas foram cultivadas (figura 13). Plantas cultivadas em AP reprimiram a colonização micorrízica de arbúsculos e de hifas intrarradiculares quando comparado às plantas cultivadas em BP. Plantas cultivadas em AP apresentaram redução de 12,5 e 4,3 vezes na frequência do número de

arbúsculos e de hifas intrarradiculares quando comparados às plantas cultivadas em BP, respectivamente.

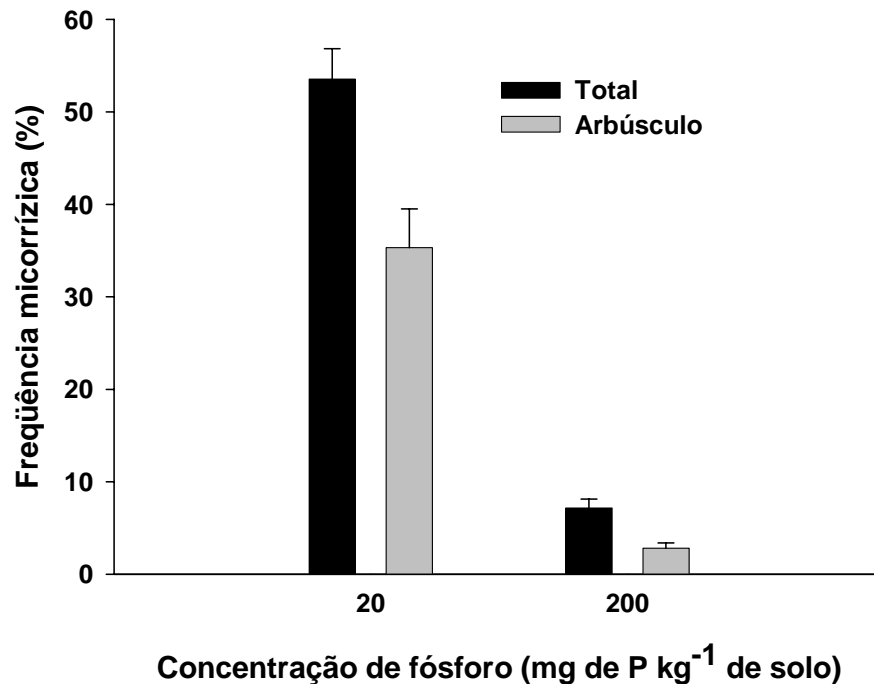


Figura 13 – Colonização total e frequência de arbúsculo intrarradiculares de *Glomus clarum* em cana-de-açúcar cultivada em solo com 20 (BP) e 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup>. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

#### 2.4.8 Produção de biomassa seca das raízes

A produção de biomassa seca das raízes foi dependente da concentração de Imazapique e da concentração de P no solo, porém independente da presença do FMA. Imazapique aplicado ao solo nas concentrações estudadas promoveu uma depressão da produção de biomassa seca das raízes em relação às plantas cultivadas em solo sem herbicida (figura 14), independente da concentração de P no solo.

As plantas cultivadas em AP e em solos sem Imazapique apresentaram maior produção de biomassa seca das raízes do que as plantas que receberam o herbicida. Já, as plantas cultivadas em BP e em solo sem Imazapique apresentaram maior produção da biomassa seca das raízes do que plantas cultivadas em solo tratado com dose integral (30,8mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) ou o dobro desta dose.

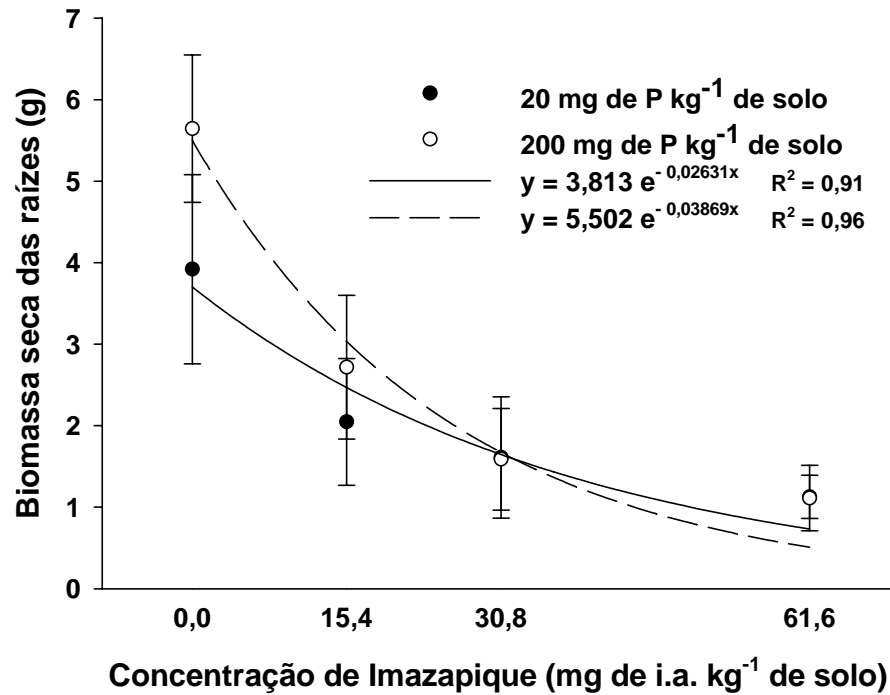


Figura 14 – Variação da biomassa seca das raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

Plantas cultivadas em AP e BP, e que receberam Imazapique na maior dose estudada (61,6mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) apresentaram redução de 80 e 71 % na produção de biomassa seca das raízes quando comparadas às plantas cultivadas em solo sem herbicida, respectivamente.

#### 2.4.9 Área superficial das raízes

A área superficial das raízes foi dependente de duas duplas interações envolvendo a concentração de Imazapique com a concentração de P no solo (figura 15) e com a presença do FMA (figura 16).

As plantas cultivadas em AP e em solo sem Imazapique apresentaram maior produção de área superficial das raízes do que as plantas cultivadas em solo tratado com metade da dose recomendada de Imazapique (15,4mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo), seguida por sua vez de doses superiores à esta. As plantas cultivadas em BP e em solo sem Imazapique apresentaram maior produção de área superficial de raízes do que as plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique. As plantas cultivadas em AP e em solo sem Imazapique apresentaram maior ganho

de área superficial de raízes quando comparadas às plantas cultivadas em BP e na ausência do herbicida. As plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quando cultivadas em AP ou BP, independente da concentração de Imazapique no solo.

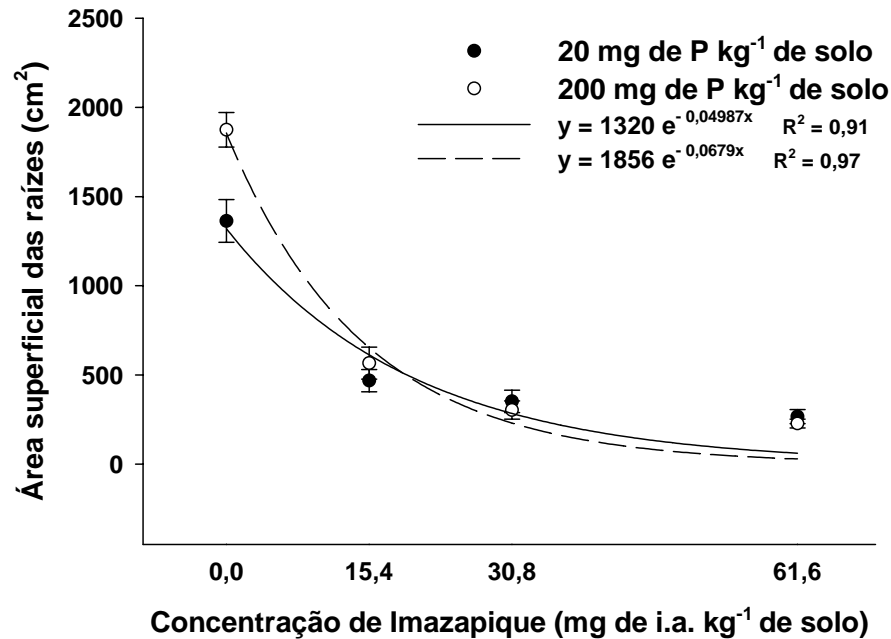


Figura 15 – Curvas e equações de regressão exponencial representativas da área superficial das raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

A aplicação do herbicida Imazapique mesmo na menor dose estudada (15,4mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) promoveu uma redução de 65 e 70 % na área superficial das raízes das plantas cultivadas em BP e AP, respectivamente.

Imazapique aplicado ao solo nas concentrações estudadas promoveu uma depressão da produção de biomassa seca das raízes em relação às plantas cultivadas em solo sem herbicida, independente da presença do inóculo. As plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si, independente da presença do inóculo.

A área superficial das raízes não foi significativamente afetada pela inoculação com *G. clarum* ( $p < 0,05$ ). O uso do herbicida em doses iguais ou maiores do que 0,5x a dose recomendada (15,4mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) promoveu uma redução na área superficial das raízes

de aproximadamente 79 e 76% nas plantas tratadas com Imazapique e inoculadas ou não com *G. clarum*, respectivamente.

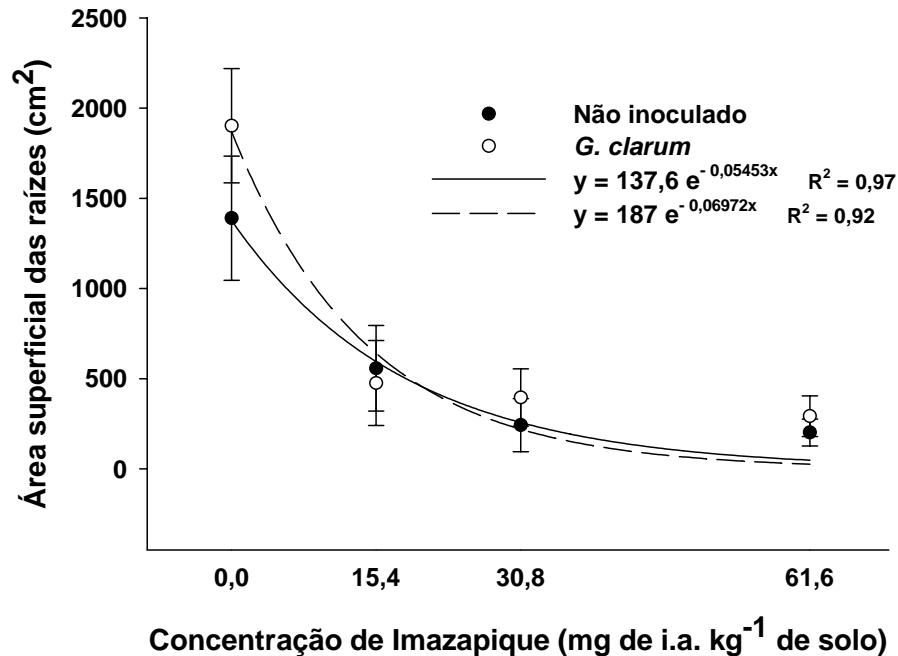


Figura 16 – Variação da área superficial das raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* e cultivadas em solo tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições  $\pm$  desvio padrão da média

#### 2.4.10 Produção de biomassa seca da parte aérea

A produção de biomassa seca da parte aérea foi dependente da concentração de Imazapique e da concentração de P no solo, porém independente da presença do FMA (figura 17). Nas plantas cultivadas em solo sem herbicida e em AP houve um ganho maior de biomassa seca da parte aérea quando comparado às plantas cultivadas em BP e sem Imazapique. As plantas cultivadas com Imazapique não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de biomassa seca da parte aérea, independente da concentração do herbicida e da concentração de P em que as plantas foram cultivadas. No entanto, em plantas cultivadas em AP ou em BP e sem Imazapique apresentaram maior produção de biomassa seca da parte aérea do que as plantas tratadas com herbicida, independente da dose.

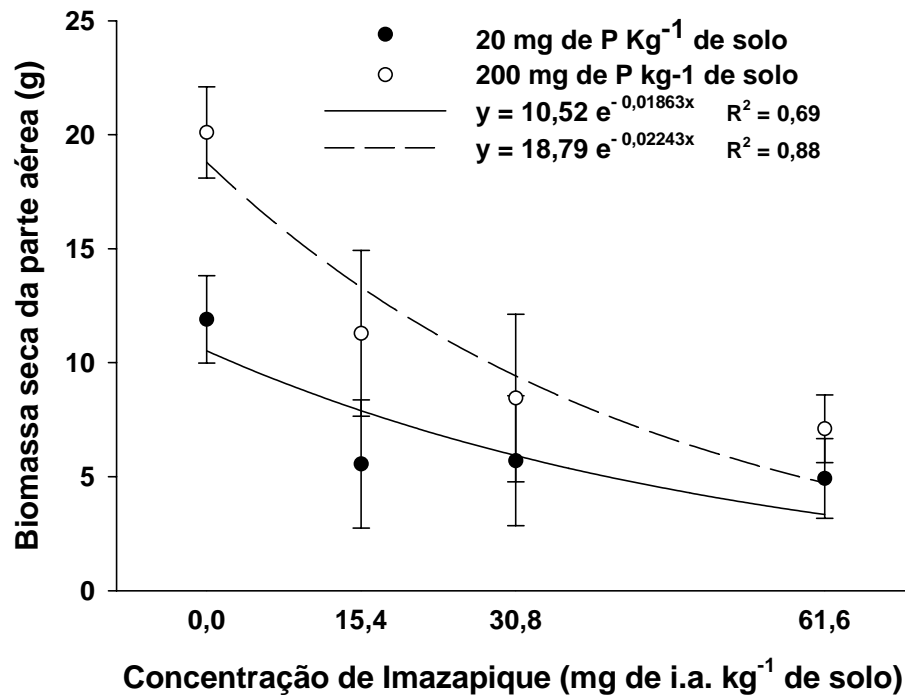


Figura 17 – Biomassa seca da parte aérea de cana-de-açúcar cultivada em solo com 20 (BP) ou 200 (AP) mg P kg<sup>-1</sup> e tratado com Imazapique. Os dados são médias de 5 repetições ± desvio padrão da média

O uso de Imazapique, mesmo na menor dose (15,4mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) promoveu uma depressão na produção de biomassa seca da parte aérea em torno de 53 e 43% em plantas cultivadas em BP e AP, respectivamente.

## 2.5 Discussão dos resultados

A produção de biomassa seca foi maior nas plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique quando comparado às plantas cultivadas em solo tratado com Ametrina. Embora ambos experimentos tenham sido conduzidos em casa-de-vegetação com temperatura controlada, a época do ano na qual os experimentos foram conduzidos pode ter influenciado na produção de biomassa seca das plantas. Enquanto o experimento utilizando Ametrina foi conduzido nos meses de maio a agosto, o experimento utilizando Imazapique foi conduzido nos meses de setembro a novembro. O aumento da intensidade luminosa na primavera pode ter proporcionado melhores condições para o desenvolvimento das plantas, resultando em maior produção de matéria seca.

O uso da solução nutritiva de Sarruge (1975) demonstrou ser suficiente para o suprimento dos nutrientes necessários para o bom desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vaso de 3 Kg de solo. Durante o desenvolvimento da cultura nenhum sintoma de deficiência nutricional foi observado nas plantas cultivadas sem a aplicação dos herbicidas.

Embora existam inúmeros trabalhos relatando os efeitos do uso de herbicidas na cultura de cana-de-açúcar, dados sobre o efeito do uso de herbicidas na comunidade de FMAs em cana-de-açúcar não foram encontrados. Já, o efeito de diferentes herbicidas sobre os FMAs em outras culturas variam da supressão à indução na formação das MAs (TRAPPE; MOLINA; CASTELLANO, 1984).

A germinação de esporos de *G. clarum* em solos tratados com Ametrina não foi influenciada significativamente, sugerindo que seu efeito inibitório sobre o transporte de elétrons na fase luminosa da fotossíntese em plantas não afeta diretamente o metabolismo primário do fungo, como já havia sido observado por Smith, Noack e Cosh (1981).

Já, em solos tratados com Imazapique houve efeito inibitório sobre a germinação de esporos. Essa inibição pode ter ocorrido devido ao efeito do Imazapique, na síntese de aminoácidos essenciais para o metabolismo do fungo, durante o processo de germinação (TOMMERUP; BRIGGS, 1981).

Além do efeito direto sobre o fungo micorrízico, os herbicidas podem alterar o metabolismo das plantas hospedeiras, exercendo efeito indireto sobre a comunidade de FMAs do solo. A aplicação de Ametrina no solo não teve efeito sobre a colonização micorrízica. Da mesma forma Garcia-Romera, Miquel e Ocampo (1988), estudando o efeito de Cimazine, outro herbicida da classe das triazinas, sobre a colonização micorrízica e crescimento de *Pisum sativum* não observaram efeito significativo do herbicida na colonização micorrízica. Os autores concluíram que não houve efeito direto de Cimazine na colonização micorrízica arbuscular e que o efeito benéfico das micorrizas desaparecem quando o herbicida é aplicado na dose recomendada para uso em condições de campo.

Embora Imazapique tenha apresentado efeito inibitório sobre a germinação dos esporos, o efeito indireto deste herbicida sobre as plantas hospedeiras pode ter favorecido o aumento da colonização intrarradicular em condições de BP. Imazaquin, um herbicida da classe das Imidazolinonas, foi capaz de alterar o metabolismo do hospedeiro e aumentar o nível de açúcar livre e aminoácidos na planta (SHANER, 1989 apud SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991). É



possível que as alterações na fisiologia das raízes tenham favorecido a exudação de compostos que estimulam o crescimento fúngico (POPE; HOLT, 1980) ou tenham inibido a ação fungistática do herbicida (SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991). Além disso, os herbicidas podem alterar o metabolismo de compostos fenólicos, aumentando a acumulação dos flavonóides nas raízes, os quais afetam a colonização micorrízica (LAMAN et al., 1969 apud SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991).

A formação de esporos intrarradiculares foi afetada pelo herbicida Imazapique. O aumento do número de esporos pode ser consequência da condição adversa que o fungo encontrou para se desenvolver, sendo a esporulação uma alternativa segura para perpetuação da espécie. Em Citros (*Citrus aurantium*) e em trigo (*Triticum aestivum*) o uso dos herbicidas Diallylate e Diuron também estimularam a produção de esporos, respectivamente (TRAPPE; MOLINA; CASTELLANO, 1984).

Imazapique não afetou a formação de arbúsculos em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum*, a qual foi significativamente afetada pelo nível de P no solo. Lambais e Mehdy (1995) sugerem que alterações no balanço hormonal causadas pela infecção fúngica, em condições de baixos níveis de P na planta, poderiam resultar na supressão do sistema de defesa vegetal, possibilitando o estabelecimento da simbiose. De maneira inversa, altos níveis de P poderiam induzir a expressão de certas proteínas de defesa específicas, inibindo o crescimento fúngico intrarradicular e diferenciação dos arbúsculos.

A colonização intrarradicular nas plantas de cana-de-açúcar cultivada em BP foi suficiente para alterar a fisiologia radicular das plantas tratadas com Ametrina. Embora o fungo não tenha exercido efeito sobre a produção de biomassa seca de raízes, a presença do mesmo foi capaz de estimular o aumento da área superficial e do comprimento de raízes nas plantas cultivadas em BP. Resultados semelhantes foram obtidos por Azcón-Aguilar et al. (1996), os quais estudando o efeito das MAs no crescimento de raízes de plantas micropropagadas, observaram que a micorriza favoreceu o desenvolvimento da planta (raiz, folha e caule).

Uma possível explicação para o aumento da área superficial e comprimento de raízes observados em cana-de-açúcar micorrizadas seria a alteração no balanço hormonal nas raízes. O aumento nos níveis dos fitohormônios auxinas e citocininas em raízes de plantas micorrizadas reforçam a teoria que FMA são capazes de alterar o metabolismo das raízes, favorecendo o aumento das mesmas (DANNEBERG et al., 1993; BARKER; TAGU, 2000).

O efeito da aplicação dos herbicidas no solo foi mais expressivo no crescimento vegetativo das plantas, promovendo uma depressão significativa na produção de biomassa seca. Embora ambos herbicidas sejam recomendados para a cultura da cana-de-açúcar, Imazapique causou maior dano às plantas, possivelmente devido ao seu menor efeito seletivo, quando comparado à Ametrina. Tanto Imazapique quanto Ametrina são prontamente absorvidos pelas raízes e translocados para as folhas (SHANER 1989 apud SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991; VOSTRAL; BUCHHOLTZ; KUST, 1970). O aumento dos sintomas de injúrias promovidos pelo uso destes herbicidas podem estar relacionados ao pH do solo. Quando aplicados em solos levemente ácidos, estes herbicidas sofrem desprotonações nos grupos funcionais, e a forma ionizada, sendo mais solúvel, pode causar maior injúria às plantas (STOUGAARD; SHEA; MARTIN, 1990; ESSER et al., 1975). O baixo teor de argila e de M.O. também favorecem a menor adsorção, aumentando a fitotoxicidade. (LOUX; LIEBL; SLIFE, 1989; GARCIA-ROMERA; MIQUEL; OCAMPO, 1988).

Apesar da alta correlação negativa entre a concentração do herbicida no solo e a produção da biomassa seca em plantas cultivadas sob condições controladas de temperatura e umidade, o mesmo efeito nem sempre é observado em condições de campo, onde a influência do clima é tão importante quanto do tipo de solo (HANCE; HOCOMBE; HOLROYD, 1968; LOUX; LIEBL; SLIFE, 1989).

O uso de solo autoclavado pode também ter suprimido os efeitos benéficos que os FMA nativos promovem, diminuindo a tolerância das plantas hospedeiras ao uso dos herbicidas (SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991).

A complexidade dos mecanismos envolvidos e a baixa dependência micotrófica existente na cultura da cana-de-açúcar (SIQUEIRA; FRANCO, 1988) parecem ser os principais fatores da ausência do efeito benéfico que os FMAs exercem em outras culturas quando cultivadas sobre sistemas adversos.

## 2.6 Conclusões

- Imazapique influencia diretamente a germinação de esporos de *G. clarum*, o mesmo não ocorre com Ametrina;
- Plantas cultivadas em BP apresentaram maior colonização intrarradicular;

- O uso de Imazapique na concentração recomendada para o campo induz a maior taxa de colonização micorrízica em plantas cultivadas em BP. O uso de Ametrina até o dobro da dose recomendada para o campo, não afeta significativamente a colonização micorrízica.
- As MAs não foram capazes de aliviar os efeitos deletérios promovido pelo uso dos herbicidas na produção de biomassa seca total das plantas;
- Plantas cultivadas em AP apresentaram maior produção de matéria seca total que as plantas cultivadas em BP;

### Referências

- ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N. **Guia de herbicidas**. 3.ed. Londrina: [s.n.], 1995. 675p.
- ASHTON, F. M.; CRAFTS, A. S. **Mode of action of herbicides**. New York: John Wiley, 1973. 504p.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n.1, p. 3-42, May 2001.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n.1/4, p. 1-24, Mar. 1997.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; PADILLA, I. G.; ENCINA, C. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances plant growth and changes root system morphology in micropropagated *Annona cherimola* Mill. **Agronomie**, Paris, v. 16, n.10, p. 647-652, 1996.
- BARKER, S. J.; TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, n .2, p. 144-154, June. 2000.
- BODKER, L.; KJOLLER, R.; ROSENDAHL, S. Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. **Mycorrhiza**, Berlin, v.8, n.3, p. 169-174, Nov. 1998.

BONFANTE-FASOLO, P.; PEROTTO, S. Strategies of mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, New York, v.119, n.1, p. 115-120, Jan. 1991.

\_\_\_\_\_. Plant and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: VERMA, D.P.S. (Ed.) **Molecular signals in plant-microbe communications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. chap. 14, p. 445-470.

CARVALHO, J. C. Mecanismo de ação dos herbicidas e sua relação com a resistência a herbicidas. In: CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEJERO, R.F.L.; CARVALHO, J. C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004. 100 p.

DANNEBERG, G. LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 141, n. 1, p. 33-39, Jan. 1993.

DAVIES, F. T.; PURYEAR, J. D.; NEWTON, R. J.; EGILLA, J. N.; GROSSI, J. A. S. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.158, n.6, p. 777-786, June, 2001.

DEVINE, M.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. 441 p.

DUBACH, P. Introduction to Triazine-soil interaction. **Residue Review**, New York, v. 32, p. 19-29, 1970.

ESSER, H. O. S-Triazines In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action**. 2.nd ed. New York: Marcel Dekker, 1975. chap. 2 500 p.

EZETA, F. N.; SANTO, O. M. Benefício da introdução de endomicorriza eficiente na utilização de nutrientes em solos do sul da Bahia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.4, n.1, p. 13-17, jan./abr. 1980.

FERNANDES, A. J. **Manual da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 1984. 196 p.

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

GARCIA-ROMERA, I.; MIQUEL, J. A.; OCAMPO, J. A. Effect of cyanazine on va mycorrhizal infection and growth of *Pisum sativum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 207-210, Apr. 1988.

GAST, A. Use and performance of triazine herbicides on major crops and major weeds throughout the world. **Residue Review**, New York, v. 32, p. 11-18, 1970.

GERDEMANN, J. W.; NICOSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v.46, p. 235-244, 1963.

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

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, n.3, p. 489-500, Mar. 1980.

HAMEL, C.; MORIN, F.; FORTIN, A.; GRANGER, R. L.; SMITH, D. L. Mycorrhizal Colonization Increases Herbicide Toxicity in Apple. **Journal of American Society of Horticulture Science**, Alexandria, Virginia, v. 119, n. 6, p. 1255-1260, Nov. 1994.

HANCE, R. J.; HOCOMBE, S. D.; HOLROYD, J. The phytotoxicity of some herbicides in field and pot experiments in relation to soil properties. **Weed Research**, Oxford, UK, v. 8, n. 2, p. 136-144, June 1968.

HECKER, M.; GIESY, J. P.; JONES, P. D.; JOOSTE, A. M.; CARR, J. A.; SOLOMON, K. R.; SMITH, E. E.; KRAAK, G. van der; KENDALL, R. J.; PREEZ, L. du Plasma sex steroid concentrations and gonadal aromatase activities in african clawed frogs (*Xenopus laevis*) from south africa. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 8 p. 1996-2007, 2004.

JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicadas a ciência do solo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., 1996, Águas de Lindóia. **Resumos...** Campinas: SBCS, 1996. 1 CD-ROM.

KAISER, P.; POCHON, J. J.; CASSINI, R. Influence of triazine herbicides on soil microorganisms. **Residue Review**, New York, v. 32, p. 211-230, 1970.

KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1975. 500 p.

KISSMANN, K. G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Disponível em: <[http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto\\_reisitencia\\_herbicidas.doc](http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_reisitencia_herbicidas.doc)>. Acesso em: 03 maio 2006.

LAMBAIS, M. R. **Condições edáficas que afetam o micotrofismo de *Stylosanthes guianensis* (AUBL.) SW**. 1987. 102p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

LAMBAIS, M. R.; MEHDY, M. C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 73, n. 4, p. 533-540. Apr. 1995.

LEITE, C. R. F.; ALMEIDA, J. C. V.; PRETE, C. E. C. **Aspectos fisiológicos, bioquímicos e agronômicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS (AHAS)**. Londrina: [s.n.], 1998. 68 p.

LOUX, M. M.; LIEBL, R. A.; SLIFE, F. W. Adsorption of imazaquin and imazethapyr on soils, sediments, and selected adsorbents. **Weed Science**, Champaign, v. 37, n.5, p. 712-718, Sept. 1989.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

NEMEC, S.; TUCKER, D. Effects of herbicides on endomycorrhizal fungi in Florida citrus (*Citrus spp.*) soils. **Weed Science**, Champaign, v. 31, n. 4, p. 427-431, Jul. 1983.

OLIVEIRA, J. B.; PRADO, H. Carta pedológica semi-detalhada do Estado de São Paulo: quadricula de Piracicaba. 1:100.000. **Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, 1989.

PANG, S. S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 278, n. 9, p. 7639-7644, Feb. 2003.

POPE, P.E.; HOLT, H.A. Paraquat influences development and efficacy of the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 5, p. 518-521, May 1980.

REEDER, A. L.; RUIZ, M. O.; PESSIER, A.; BROWN, L. E.; LEVENGOOD, J. M.; PHILLIPS, C. A.; WHEELER, M. B.; WARNER, R. E.; BEASLEY, V. R. Intersexuality and the Cricket Frog Decline: Historic and Geographic Trends. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 3, p. 261-265, Mar. 2005.

RODRIGUES, R. Século XXI, o novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 1, p. 4-7, jan-jun. 2004.

SARRUGE, J. R. Soluções Nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 1, n. 3, p. 231-233, 1975.

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

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

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 233-242, July 1991.

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

SMITH, T. F.; NOACK, A. J.; COSH, S. M. The effect of some herbicides on vesicular-arbuscular endophyte abundance in the soil and on infection of host roots. **Pesticide Science**, Chichester, v.12, n.1, p. 91-97, Feb. 1981.

STOUGAARD, R. N.; SHEA, P. J.; MARTIN, A. R. Effect of soil type and pH on adsorption, mobility, and efficacy of imazaquin and imazethapyr. **Weed Science**, Champaign, v. 38, n. 1, p. 67-73, Jan. 1990.

TAKAHASHI, D.; MATSUOKA, S.; MENEGHIN, S.P. Diferencial de micorrizas arbusculares de solo virgem e de solo cultivado com cana-de-açúcar. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 1998 São Carlos. **Resumos...** São Carlos: Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 1998. p.BA082

TAN, S. Y.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 3, p. 246-257, Mar. 2005.

TOMMERUP, I. C.; BRIGGS, G. G. Influence of agricultural chemicals on germination of vesicular-arbuscular endophyte spores. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, v.76, p. 326-328, Apr. 1981.

TRAPPE, J. M.; MOLINA, R.; CASTELLANO, M. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. **Annual Review in Phytopathology**, Palo Alto, v.22, p. 331-359, 1984.

UHLIG, S. K. Über den Einfluss von Chlor-bis-athylamino-s-triazins (Simazin) auf die Bildung Ektotropher Mykorrhiza bei *Picea abies* L. Karsten und *Pinus silvestris* L. **Archiv für Forstwesen**, New York, v. 15, p. 436, 1966.

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

VOSTRAL, H. J.; BUCHHOLTZ, K. P.; KUST, C. A. Effect of rot temperature on absorption and translocation of atrazine in soybeans. **Weed Science**, Champaign, v. 18, n. 1, p. 115-117, Jan. 1970.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, n.9, p. 575-586, Sept. 1996.



### 3 PERFIL TRANSCRICIONAL DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM *G. clarum* E TRATADAS COM IMAZAPIQUE

#### Resumo

Micorriza arbuscular (MA) é uma associação simbiótica que ocorre entre inúmeras plantas e o fungo microsimbionte, permitindo o desenvolvimento de plantas sob condições limitantes de nutriente e de estresse. Mudanças significativas na morfologia e fisiologia radicular durante o desenvolvimento da MA parecem ser controladas pela expressão específica de gene da planta hospedeira. Vários estudos tentam compreender as mudanças transcricionais durante a simbiose MA, porém o efeito do uso de herbicidas na formação micorrizica permanece ainda desconhecido. Neste trabalho, foi usado o perfil de transcrição baseado na hibridização de arranjos de cDNA e da hibridização subtrativa supressiva (HSS) para identificar genes de cana-de-açúcar colonizadas por FMA e cultivadas na presença de Imazapique. Através de hibridização em macroarranjo de cDNA, foi possível detectar vários genes com expressão diferencial estatisticamente significativa em raízes micorrizadas e não- micorrizadas cultivadas em solo tratado com herbicida. Dentre as proteínas codificadas pelos genes com expressão induzida em raízes micorrizadas, em relação ao controle não-inoculado, se destacam um receptor de glutamato, uma metalotioneína, uma ATP sintase, e várias com função desconhecida. Já, dentre os genes com expressão suprimida estão: a proteína WALI7, uma proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, uma tubulina e uma remorina. Nas raízes não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique as proteínas codificadas pelos genes com expressão induzida são: um receptor de glutamato e uma proteína tipo lipase; e dentre as que foram suprimida está a proteína transcritase reversa. O Imazapique altera a expressão de vários genes modulados pela MA, dentre as proteínas codificadas por esses genes estão: uma ATP sintase, uma proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, uma poliubiquitina, uma tubulina, uma quinase de histidina e várias com função desconhecida. Os resultados indicam que a formação MA altera o programa genético das raízes de cana-de-açúcar e que o herbicida Imazapique altera a expressão dos genes relacionados à simbiose de cana-de-açúcar com *G. clarum*.

**Palavras-chave:** Fungo Micorrízico Arbuscular; Micorrizas Arbusculares; Imidazolinona; macroarranjo; *Saccharum* spp.; expressão gênica.

#### Abstract

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a widespread symbiotic association between plants and fungal microsymbionts that supports plant development under nutrient-limiting and various stress conditions. Significant changes in root morphology and physiology during AM development are likely to be controlled by specific gene expression pattern in the host plant. Several studies try to understand the transcriptome change in AM symbiosis, but the effect of the use of herbicides on the mycorrhizal formation are still unknown. In this study, we used a transcriptome profiling based on cDNA array hybridizations and suppressive subtractive hybridization (SSH) to identify sugarcane genes induced in arbuscular mycorrhiza (AM) growing in the presence of Imazapic. By macroarray cDNA hybridizations, it was possible to detect several genes with differential

expression statistically significant in AM plants, and plants not inoculated growing in soil treated with herbicide. Among the proteins codified by genes with induced expression in AM roots, compared to the control no-inoculated, are: a putative ionotropic glutamate receptor, a metallothionein-like protein, a ATP synthase and many others with unknown function. Whereas, among the proteins codified by genes with suppressed expression are: Wali7 protein, a ubiquitin-dependent protein catabolism, a tubulin alpha-1 chain and a remorin. In the no-inoculated roots growing in the soil treat with Imazapic the proteins codified by genes with induced expression are: a putative ionotropic glutamate receptor and a lipase-like; and the reverse transcriptase like protein was suppressed. The Imazapic treatment alter several gene expression modulated by AM, among the proteins codified by those genes are: a ATP synthase, a ubiquitin-dependent protein catabolism, polyubiquitin, a tubulin alpha-1 chain, a signal transduction histidine kinase and many others with unknown function. The results indicate the AM formation alter the sugarcane roots genetic program and that the Imazapic herbicide alter the gene expression related to symbioses between sugarcane with *G. clarum*.

**Keywords:** Arbuscular Mycorrhiza Fungi; Arbuscular Mycorrhiza; Imidazolinone; macroarray; *Saccharum* spp.; gene expression.

### 3.1 Introdução

Os estudos de expressão gênica permitem compreender os princípios que regem o crescimento, o desenvolvimento e as respostas dos organismos ao ambiente. A clonagem e identificação dos genes diferencialmente expressos permitem identificar sua função e auxilia a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação de diferentes processos celulares.

Desde as descobertas pioneiras de Mendel, a expressão dos genes vem sendo estudada tentando compreender melhor os princípios que regem o crescimento, o desenvolvimento e as respostas resultantes das interações dos organismos com o ambiente. Assim, entender como os elementos na seqüência de DNA são utilizados para a expressão gênica, em que condições cada produto gênico é sintetizado e qual a sua função na célula, são questões que intrigam os cientistas.

As variedades modernas de cana-de-açúcar foram obtidas através de cruzamentos entre espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, constituídas de diferentes números de cromossomos. Por isso, o genoma do híbrido apresenta complexos eventos de organização e recombinação cromossômica, dificultando o seu sequenciamento. Tentando compreender melhor o complexo genoma da cana, foi criado o projeto SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag), financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e pela antiga COOPERSUCAR (Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São

Paulo). Neste projeto, 26 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de vários tecidos e de diferentes fases de desenvolvimento, amostrados de 13 diferentes cultivares. Foram seqüenciados 237.954 ESTs, totalizando 43.141 *clusters*, dos quais 38% não apresentaram semelhança com nenhuma outra seqüência depositada nos bancos de dados públicos. No entanto, bibliotecas de interações de cana-de-açúcar com FMAs não foram contempladas.

Para entender os mecanismos que regulam o desenvolvimento de MAs em cana-de-açúcar, foram construídas 4 bibliotecas de cDNA de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *Glomus clarum* cultivadas em condição de BP e AP. A construção das bibliotecas permitiu a identificação de 1925 ESTs representando 1615 genes, dos quais mais de 40% não possuíam similares no banco SUCEST (TAKAHASHI, 2005).

O uso de herbicida nas plantações de cana-de-açúcar é uma prática rotineira, porém pouco se conhece sobre o efeito de herbicidas no desenvolvimento de MAs. Foi observado experimentalmente na dose recomendada para aplicação no campo que Ametrina não afeta a germinação de esporo ou a colonização intrarradicular em cana-de-açúcar e que Imazapique inibe a germinação de esporos, mas estimula a colonização intrarradicular.

Procurando compreender melhor o efeito do herbicida Imazapique sobre a formação de MAs, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum*, na presença de Imazapique, através da análise dos transcritomas por hibridização em macroarranjos de cDNAs.

## **3.2 Revisão bibliográfica**

### **3.2.1 Expressão gênica**

Seqüências expressas (ESTs - Expressed Sequence Tags) são obtidas a partir do seqüenciamento do DNA complementar (cDNA) derivado da transcrição reversa de RNA mensageiro (mRNA) de um organismo, ou de um tecido e ou até mesmo de uma única célula. Os adeptos deste método alegam que a seqüências codificadora dos genes representam a vasta maioria do conteúdo informativo do genoma (Brenner, 1990), e que, por serem seqüenciadas apenas uma vez (*single-pass*), o seqüenciamento de ESTs se torna uma técnica mais eficiente, rápida e econômica para a identificação dos genes preferencialmente expressos em certos tecidos ou tipos de células de organismos multicelulares (ADAMS et al., 1991).

As seqüências de ESTs podem ser usadas juntamente com o mapeamento físico para a localização exata do gene no cromossomo (ADAMS et al., 1991). Também assim, ESTs podem ser usados na análise em larga escala da expressão gênica (CUSHMAN; BOHNERT, 2000) e para acessar informações genéticas de espécies de genomas complexos, como a cana-de-açúcar (GRIVET; ARRUDA, 2002).

Várias técnicas para a análise de expressão gênica ao nível de transcrição foram desenvolvidas, tais como: *Northern blotting* (ALWINE; KEMP; STARK, 1977), Differential Display – *DD* (LIANG; PARDEE, 1992), Serial Analysis of Gene Expression – *SAGE* (VELEULESCU et al., 1995), *Dot Blots* (LENNON; LEHRACH, 1991), DNA array (BROWN; BOTSTEIN, 1999) e Real Time - PCR – *RT-PCR* (HOLLAND et al., 1991; VITZTHUM et al., 1999). Entretanto, alguns destes métodos não permitem a análise simultânea de um grande número de genes. No entanto, técnicas como hibridização em arranjos de cDNA, permitem avaliar os níveis relativos de mRNA de milhares de genes simultaneamente, fornecendo uma visão geral das alterações que ocorrem no transcrito e possibilitando a identificação de possíveis mecanismos de regulação.

Os arranjos de DNA são construídos em suporte sólido (membranas de náilon ou placas de vidro), onde os DNA-alvos (produtos de PCR, plasmídeos ou bactérias contendo os plasmídeos) são depositados de maneira ordenada (NGUYEN et al., 1995). Os arranjos são então hibridizados com uma população de cDNA marcada com fluoróforos ou isótopos radioativos (Sondas de cDNA). Após lavagem para retirar o excesso de sonda dos arranjos, o sinal de hibridização proporcional à concentração de um determinado mRNA na população original, é detectado (PERRET et al., 1998).

Algumas características diferenciam os arranjos de DNA. Os microarranjos utilizam *slides* de vidro ou *chips* de silício, enquanto que os macroarranjos utilizam membranas de náilon. A impressão dos DNA-alvos é feita com o auxílio da robótica nos microarranjos e pode ser tanto de fragmentos de cDNA como de oligonucleotídeos. Já, nos macroarranjos a impressão pode ser feita manualmente e podem ser usados produtos de PCR, plasmídeos ou ainda bactérias contendo plasmídeos. A marcação das sondas em microarranjos normalmente é feita com fluoróforos (Cy3 e Cy5), em macroarranjos é feita com isótopos radioativos de P ( $^{32}\text{P}$  ou  $^{33}\text{P}$ ) (SCHENA et al., 1995; CHEE et al., 1996; LASHKARI et al., 1997).

Na confecção das membranas de macroarranjo, o produto de PCR de clone de cDNA é transferido para a membrana manualmente e fixados por tratamento com luz UV. As sondas são produzidas a partir de RNA total, através de reação de transcrição reversa na presença de  $\alpha$ -<sup>33</sup>-P-dCTP. Os cDNAs marcados são hibridizados com os produtos de PCR nas membranas.

Considerando que os *spots* de DNA-alvo contêm uma quantidade uniforme de produto de PCR ou plasmídeo, então quanto maior a expressão de um determinado gene, em uma determinada condição (biológica ou ambiental), maior é o número de moléculas de mRNA referente àquele gene, sendo maior o número de cDNAs marcados na sonda sintetizada e, conseqüentemente, maior o valor da intensidade do sinal detectado quando a sonda é hibridizada com a seqüência específica de DNA (FELIX et al. 2002).

### 3.2.2 Expressão gênica em *Saccharum* spp.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), originária do Sudeste Asiático, é uma gramínea da tribo Andopogoeae, família Poaceae (Gramineae). Das seis espécies de cana-de-açúcar conhecidas, duas são consideradas silvestres: *S. robustum* e *S. spontaneum*, e quatro cultivadas: *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (DANIELS; ROACH, 1987).

Os cultivares atuais de cana-de-açúcar são híbridos derivados de cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum* (2n = 80 cromossomos) e *Saccharum spontaneum* (2n = 128 cromossomos), seguidos de uma série de retrocruzamentos com *S. officinarum*. Esses híbridos possuem complexa organização cromossômica, com 100 a 130 cromossomos e formam híbridos aneuplóides (GRIVET et al., 1996). Este processo é conhecido como “nobilização”, através do qual se obtém a chamada “cana nobre” (SILVA et al., 1993).

Para entender genética da cana-de-açúcar, vários projetos envolvendo o sequenciamento de ESTs de cana-de-açúcar foram iniciados na Austrália (Bureau of Sugar Experimental Stations – BSES), África do Sul (South African Sugar Association Experiment Station – SASEX), Estados Unidos da América (American Society of Sugar Cane Technologists – ASSCT) e Brasil (Sugarcane Expressed Sequence Tag Project – SUCEST) (BARSALOBRES, 2004).

No Brasil, o SUCEST sequenciou 237.954 ESTs de 26 bibliotecas de cDNA de vários tecidos e de diferentes fases de desenvolvimento, amostrados de 13 diferentes cultivares (ARRUDA, 2001), resultando em 43.141 *clusters*, dos quais 38% não apresentaram semelhança com nenhuma outra seqüência depositada nos bancos de dados públicos (VETTORE et al.,

2001). Como extensão do SUCEST, Takahashi (2005) analisou seqüências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por FMA. Neste estudo, quatro bibliotecas de cDNA (MY1, MY2, MY3 e MY4) e uma biblioteca subtrativa supressiva (MS1) foram construídas, resultando na identificação de 1925 ESTs representando 1615 genes. Destes, 386 com expressão diferencial putativa em raízes micorrizadas foram selecionados e arranjados em membranas de náilon.

Dentre os genes diferencialmente expressos identificados, foram obtidos genes codificando proteínas putativas envolvidas na percepção de moléculas sinais (receptor tipo quinase de proteína), transporte de íons (canais de íons), transdução de sinais (quinases de proteína e calmodulina), regulação da transcrição (fatores de transcrição), alterações de parede celular e citoesqueleto (extensina, arabinogalactanas, tubulinas), respostas de defesa e estresse (síntese de fitoalexinas e metalotioneínas), síntese de fitohormônios (nitrilase). Takahashi sugere que a transdução de sinais em MAs se dá através da fosforilação de proteínas e que a indução de respostas anti-oxidantes pode ser importante para o desenvolvimento da simbiose e que a atividade de aspartato-proteases pode ser essencial para o controle do crescimento fúngico intrarradicular.

### 3.2.3 Expressão gênica em MAs

A sofisticada interação mutualística entre plantas e FMAs é antiga. Existem fortes evidências de que os FMAs desempenharam papel crucial na conquista do ambiente terrestre pelas plantas (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000). Essa premissa foi confirmada com estudos de biologia molecular (SIMON et al., 1993) e por análise em materiais fósseis do Devoniano (PIROZYNSKI, 1981). Embora as associações MAs não sejam específicas, a formação e funcionamento dessa simbiose é um processo genético altamente regulado, o qual é acompanhado por modificações moleculares em ambos os parceiros.

A interação entre plantas e FMAs pode ter início antes mesmo do estabelecimento de um contato físico, através da troca de sinais moleculares (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜMER, 2002). É possível que o FMA produza um sinal análogo ao “Fator Nod”, no entanto o “Fator Myc” ainda não foi identificado. Recentemente, em experimentos com a leguminosa *Medicago truncatula* foi observado que o gene *MtENOD11* é ativado antes mesmo do contato direto com o FMA (KOSUTA et al., 2003). O gene *MtENOD11* codifica uma proteína rica em hidroxiprolina

componente da matriz extracelular que tem a sua expressão induzida durante a associação micorrízica (CHABAUD et al., 2002).

Outras evidências indiretas da existência da troca de sinais entre os simbioss já foram relatadas. Em leguminosas, os programas genéticos para a formação da simbiose com FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio parcialmente se sobrepõe. Análises de mutantes de leguminosas deficientes na formação do nodulação possibilitam a identificação de vários genes envolvidos no processo de transdução de sinais em MAs e nódulos. Os genes *SYMRK* e *DMI2* de *L. japonicus* e *M. truncatula*, respectivamente, codificam receptores quinase que atuam juntamente com o produto do gene *DMI1*, um canal de íon putativo, no reconhecimento do simbiote. Após rápidas oscilações da concentração de cálcio no citoplasma, o gene *DMI3*, codificando um quinase de proteína dependente de Cálcio/Calmodulina nuclear é ativado. *DMI3* é responsável pelo reconhecimento das oscilações de cálcio no citoplasma, intermediando a resposta transcricional que resulta no encurvamento do pêlo radicular de leguminosas. (STRACKE, et al. 2002; ENDRE, et al. 2002; ANÉ, et al. 2004; LÉVY, et al. 2004). Os mutantes defectivos para esses genes são incapazes de formar MAs ou nódulos.

A formação do apressório inicia-se logo após o contato da hifa com a superfície da raiz e provavelmente dependem de um complexo mecanismo de sinalização (GIANINAZZI-PEARSON; BRECHENMACHER, 2004). A formação do apressório foi observada somente em presença de tecido epidérmico, não sendo observada em superfícies sintéticas, mesmo na presença de exsudados radiculares que estimulam o crescimento da hifa (HARRISON, 1998). Os sinais moleculares para a formação do apressório estão presentes na epiderme, mas o desenvolvimento pleno das MAs necessita de células intactas (GADKAR et al., 2001).

As análises de mutantes de *L. japonicus* têm mostrado que a colonização das raízes pelos FMAs é controlada em três pontos: 1) abertura das células da epiderme, 2) passagem intracelular através da exoderme e, 3) formação dos arbúsculos nas células corticais mais internas (DEMCHENKO et al., 2004).

O gene *SYM15* é requerido para a abertura da superfície e para a formação do arbúsculo (DEMCHENKO et al., 2004). Mutantes *SYM15-2* não apresentam abertura das células da epiderme na presença de hifas de *G. intraradices*, e a penetração do fungo é bloqueada (KISTNER et al., 2005). Os mutantes *SYM2*, *SYM3* e *SYM4* de *L. japonicus* não são capazes de formar interações micorrízicas, e têm a colonização bloqueada na passagem intracelular pela

exoderme, não ocorrendo a colonização das células corticais (WEGEL et al., 1998), provavelmente devido à ativação do sistema de defesa vegetal (BONFANTE et al., 2000).

Após a formação do apressório, o fungo penetra na raiz colonizando os espaços intracelulares em até duas camadas de células antes de explorar o espaço extracelular do córtex da raiz (HAUSE; FESTER, 2005). A penetração e o crescimento do fungo são pré-requisitos para a colonização e o desenvolvimento de arbúsculo nas células do córtex (GENRE; BONFANTE, 2002).

Quando a simbiose se estabelece, genes envolvidos na transferência de nutrientes são ativados (KARANDASHOV, et al. 2004; CHIOU; LIU; HARRISON, 2001; LIU et al., 2003; PASZKOWSKI, et al. 2002). Experimentos conduzidos por Burleigh e Harrison (1997), utilizando *M. truncatula*, mostraram que o gene *Mt4*, codificando um transportador de fosfato vegetal, apresenta expressão regulada por P e pela colonização micorrízica. A expressão de *Mt4* foi induzida em condições de baixa disponibilidade de P, e suprimida pela adubação fosfatada e pela colonização micorrízica.

O conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento das MAs é limitado. Acredita-se que a simbiose possua mecanismos “auto-regulatórios”, onde o nível de infecção pode ser restringido à medida que a disponibilidade de P é aumentada, de maneira que o benefício líquido da simbiose seja mantido. Lambais (1996) divide em quatro grupos os genes envolvidos na defesa vegetal e modulados durante a formação de MAs: a) genes envolvidos na via biossintética de fitoalexinas isoflavonóides: fenilalanina amônia-liase (PAL), chalcone-sintase (CHS), chalcone-isomerase (CHI) e isoflavona redutase (IFR); b) genes codificando hidrolases com atividades antimicrobiana: quitinase e  $\beta$ -1,3-glicanases; c) genes codificando proteínas envolvidas no aumento da rigidez da parede celular vegetal: peroxidase e proteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs); d) genes codificando proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas): PR-b e PR1.

Lambais e Mehdy (1993) observaram aumento transiente seguido de supressão no nível de mRNA de duas isoformas de endoquitinase em raízes de feijão colonizadas por FMA. O mesmo efeito foi observado para a atividade de guaiacol peroxidase, PAL e CHI (LAMBAIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003; VOLPIN et al., 1994). Também foi observado a supressão no nível de expressão de  $\beta$ -1,3-endoglicanases, CHI e PAL (LAMBAIS; MEHDY, 1993; VOLPIN et al., 1995) após o estabelecimento da simbiose. As maiores reduções nos níveis de expressão



foram observadas em plantas cultivadas em BP, reforçando o papel do P na planta como agente regulador da interação planta-FMAs.

O possível efeito de proteínas relacionadas à patogênese (PR) no controle da colonização intrarradicular por FMAs foi estudada em plantas transgênicas de tabaco. A expressão constitutiva dos genes (*PR1*, *PR3*, *PR4* e *PR5*) não afetou o nível de colonização por *G. mosseae*. (VIERHEILIG et al., 1995). Em outro experimento, a expressão desses genes foi reduzida em raízes colonizadas por *G. mosseae*, quando comparado às plantas infectadas com *Phytophthora parasitica* (DASSI; DUMAS-GAUDOT; GIANINAZZI, 1998).

Se a aplicação de herbicidas no solo interfere na expressão de genes essenciais para o desenvolvimento das MAs, facilitando ou inibindo o crescimento do fungo e a formação de arbúculo, não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi identificar genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* e cultivadas em solo tratado com Imazapique, utilizando hibridização em macroarranjos de cDNAs.

### 3.3 Material e métodos

#### 3.3.1 Ensaio em casa-de-vegetação

O estudo foi desenvolvido em casa-de-vegetação do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ-USP, Piracicaba (SP). Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) var. SP 80-3280 foram obtidas do Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, Piracicaba, SP e plantadas em bandejas de isopor (200 células) contendo substrato composto por areia:vermiculita (2:1, vol/vol). Após aclimatação por um período de dez dias as plântulas foram transplantadas para vasos de polietileno escuro, contendo 3kg de solo latossolo vermelho-amarelo álico, A moderado, textura média, unidade laranja azeda (OLIVEIRA; PRADO, 1989), fase cerrado, esterilizado e coletado na camada superficial (0-20cm) no distrito de Artemis, Piracicaba – SP.

Ainda por ocasião do transplântio, as plântulas foram inoculadas com *G. clarum*. O inóculo constituiu de 50g de solo contendo esporos, hifas e fragmentos de raízes de milho (*Zea mays* L.) colonizadas pelo fungo, de forma a obter 300 esporos kg<sup>-1</sup> de solo. Como controle, foi utilizado solo contendo raízes de milho não colonizadas pelo fungo. Um dia após o transplântio, o solo foi adubado com 210mg N na forma de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, dividido em três aplicações a cada 20 dias), 20mg de P na forma de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 240mg de K na forma de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) e cloreto de potássio (KCl),

200mg de Ca na forma de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), 73mg de Mg na forma de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), 1mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1mL de solução de micronutrientes de Hoagland kg<sup>-1</sup> de solo, de acordo com Sarruge (1975).

A aplicação de Imazapique na concentração final de 30,8mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo foi realizada quatro semanas após o transplântio, quando as plantas apresentavam 2 folhas, representando a dose integral recomendada para a cultura da cana-de-açúcar em solo arenoso. A solução de herbicida foi obtida por diluição seriada usando água destilada esterilizada. Plantas que não receberam o herbicida foram usadas como controle. As plantas foram cultivadas por 8 semanas.

### 3.3.2 Extração de RNA

As raízes de cana-de-açúcar foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido, e o RNA total foi extraído, utilizando-se 10 volumes de uma solução monofásica (38% de fenol, 0,8 M de tiocianato de guanidina, 0,4M de Tiocianato de amônio, 0,1M de acetato de sódio pH 5,5 e 5% de Glicerol), conforme o protocolo descrito por Takahashi (2005). As raízes foram homogeneizadas com agitação vigorosa por 1 min e incubadas a 30°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo limpo onde foi adicionado 1/5 de volume de clorofórmio, as amostras foram, então, agitadas vigorosamente por 30 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 4 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000g por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo novo e foi adicionado 1/3 de volume de SSC (0,8M de citrato de sódio e 1,5M de Cloreto de Sódio) e 2/3 de volume de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas “*over night*” a -20°C e centrifugadas a 14000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com etanol 70%. O RNA peletizado foi seco por 10 min a 37°C e solubilizado em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

As amostras de RNA total foram tratadas com 10 U de DNase I livre de RNase (Boehringer Mannheim) em 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl e 20mM MgCl<sub>2</sub> e incubadas por 2 h a 37°C. O RNA foi então extraído uma vez com fenol saturado em água, uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, vol:vol:vol). O sobrenadante foi precipitado com 300 mM acetato de sódio (pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol. O pélete foi lavado com etanol 75%, seco por 10 min a 37°C e dissolvido em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC.

A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260nm ( $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g}$  de RNA  $\text{mL}^{-1}$ ). A qualidade do RNA foi determinada através das razões das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , e sua integridade através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2%, utilizando-se brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para visualização das bandas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A aquisição da imagem dos géis foi feita utilizando-se um densitômetro a laser “FluorImager SI” (Amersham Biosciences).

### 3.3.3 Preparo das sondas e hibridização em membranas de alta densidade

As sondas foram sintetizadas conforme descrito por Takahashi (2005). Resumidamente, 30 $\mu\text{g}$  de RNA total foram submetidos à transcrição reversa com Superscript III (Invitrogen) usando um iniciador oligo-dT<sub>18</sub> (4 $\mu\text{M}$ ), dCTP marcado com <sup>33</sup>P com atividade de 4000Ci  $\text{mmol}^{-1}$  e dATP, dGTP e dTTP não marcados, por 20 min a 42°C. Após este período, foi adicionado dCTP não-marcado na concentração final de 1mM, e a reação prosseguiu por mais 1 hora a 42°C. As sondas de cDNA foram purificadas utilizando microcolunas Probe Quant G-50, de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). As membranas foram inicialmente pré-hibridizadas por 2 horas utilizando uma solução de pré-hibridização (5X SSC, 20mM de Tris-HCl pH 7,5, 50% de formamida deionizada, 10X Solução de Denhardt's, 1% de SDS e 1 mg de DNA de esperma de salmão).

Em seguida, a solução de pré-hibridização foi descartada e foi adicionada às membranas a solução de hibridização (5X SSC, 20mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50% de formamida deionizada, 2X Solução de Denhardt's, 1% de SDS, 5% de Dextran e 1mg de DNA de esperma de salmão) juntamente com a sonda purificada e desnaturada. A hibridização foi feita por 18h a 42°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas seqüencialmente com as seguintes soluções: 0,2X SSC com 0,5% SDS por 20 min a 58°C (2 vezes), 0,5X SSC com 0,5% SDS por 20 min. a 58°C (2 vezes) e 0,2X SSC com 0,5% SDS por 20 min a 58°C (2 vezes), em seguida as membranas foram utilizadas para sensibilizar filmes IP (Amersham Biosciences) por 72h. O sinal de hibridização foi detectado através de varredura, utilizando-se um densitômetro STORM (Amersham Biosciences).

### 3.3.4 Análise estatística

A intensidade de sinal de cada *spot* na membrana foi obtida usando o programa ArrayVision. Após subtração de *background*, os dados foram normalizados com base na média do valor de intensidade obtida para os genes controle (actina e  $\beta$ -tubulina). Após a normalização, os dados foram transformados para  $\log_2$ . A análise gráfica foi feita para cada membrana verificando-se os valores discrepantes entre e dentro das repetições. Os valores de intensidade de sinal discrepantes foram descartados.

Os dados de intensidade do sinal de hibridização foram analisados usando o modelo misto com dois estágios (WOLFINGER et al, 2001):

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

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

Em que  $y_{ijklm}$  é o logaritmo na base dois da intensidade de sinal (expressão gênica);  $\mu$  é uma constante associada a cada observação;  $G_i$  é o efeito do gene  $i$  ( $i = 1, \dots, 384$ );  $T_j$  é o efeito do tratamento  $j$  ( $j = 1, 2, 3$  e  $4$ );  $M_k$  é o efeito aleatório da membrana  $k$  ( $k = 1, \dots, 8$ );  $Q_{(k)l}$  é o efeito do quadrante  $l$  ( $l = 1, \dots, 96$ ) dentro da membrana  $k$ , e  $r_{ijklm}$  é o erro aleatório associado a cada observação. O efeito  $Q_{(k)l}$  foi incluso para permitir o ajuste para efeito espacial na membrana. Neste modelo assume-se que os efeitos  $M_k$ ,  $Q_{(k)l}$  e  $r_{ijklm}$  possuem todos distribuição normal aleatória  $N(0, \sigma^2_M)$ ,  $N(0, \sigma^2_Q)$ ,  $N(0, \sigma^2_r)$ , e que são independentes um do outro.

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

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

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

### 3.3.5 Anotação de função dos genes

As seqüências de nucleotídeos de todos os genes utilizados nos macroarranjos foram comparadas com os bancos de dados públicos NCBI, TIGR, TAIR e SUCEST utilizando-se o programa TBLASTX.

### 3.4 Resultados

Os genes usados na impressão da membrana de náilon foram escolhidos com base em trabalho anterior, por apresentarem expressão diferencial putativa, determinada por análise *in silico* (Takahashi, 2005). Eles foram classificados em 16 categorias, de acordo com sua função biológica (tabela 1). Entre essas, as categorias: não definida (SC18), resposta à estresses (SC15) e metabolismo de RNA e transcrição (SC12) representaram mais de 51% dos genes.

Os dados de intensidade de sinal de cada membrana permitiram verificar a qualidade das repetições entre membranas do mesmo tratamento (figura 1), o efeito espacial dos genes na membrana (figura 2) e os genes diferencialmente expresso ao nível de significância de 5% (figura 3).

Tabela 1 - Classificação dos genes estudados, de acordo com sua provável função biológica e proporção dos genes que apresentaram expressão diferencial

| Categoria funcional | Função biológica                        | Número de genes na membrana | Genes com expressão diferencial (%) |
|---------------------|---|-----------------------------|-------------------------------------|
| SC1                 | Metabolismo de aminoácido               | 12                          | 83                                  |
| SC2                 | Bioenergética                           | 39                          | 56                                  |
| SC3                 | Transdução de sinais                    | 26                          | 50                                  |
| SC4                 | Dinâmica celular                        | 10                          | 90                                  |
| SC5                 | Metabolismo de DNA                      | 6                           | 66                                  |
| SC6                 | Metabolismo de lipídeos                 | 3                           | 100                                 |
| SC7                 | Elementos genéticos móveis              | 1                           | 0                                   |
| SC8                 | Metabolismo de N, P, S                  | 0                           | 0                                   |
| SC9                 | Metabolismo de nucleotídeos             | 2                           | 0                                   |
| SC10                | Crescimento e desenvolvimento da planta | 0                           | 0                                   |
| SC11                | Metabolismo de proteínas                | 25                          | 48                                  |
| SC12                | Metabolismo de RNA e transcrição        | 50                          | 60                                  |
| SC13                | Metabolismo secundário                  | 21                          | 38                                  |
| SC14                | Armazenamento de proteínas              | 0                           | 0                                   |
| SC15                | Resposta à estresses                    | 40                          | 70                                  |
| SC16                | Transporte                              | 25                          | 52                                  |
| SC17                | Proteína putativa                       | 1                           | 100                                 |
| SC18                | Não Definida (ND)                       | 102                         | 50                                  |

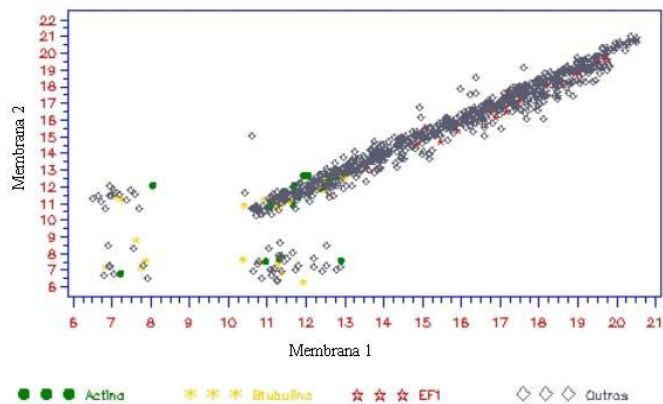


Figura 1 – Qualidade de repetições entre as membranas de plantas não-inoculadas e cultivadas em solo sem herbicidas

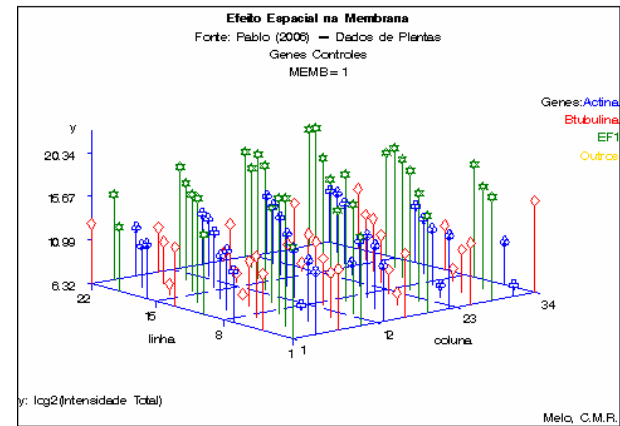


Figura 2 - Distribuição espacial da intensidade de sinal ( $\log_2$ ) dos genes controles (Actina – azul; Btubulina – vermelho e EF-1 – verde)

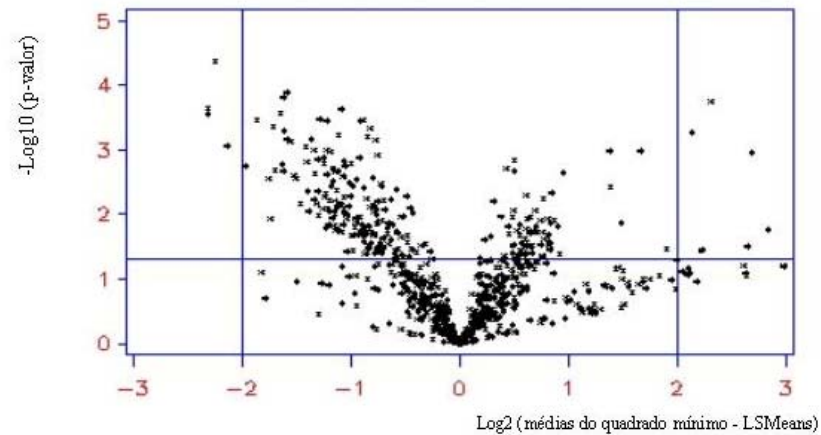


Figura 3 – Valor de probabilidade ( $\text{Log}_{10}$ ) das diferenças estimadas (LSmeans) entre os genes das plantas micorrizadas em relação ao controle não-inoculado

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continua)

| Cluster   | Maior similaridade |                |              | Anotação   | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|--------------|--|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo    |  |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY1001G07 | CP000094           | e-71           | Pseudomonas  | Amino acid adenylation                           | SC1             | 501,46             | ---   | 25,46 |
| MY2001C04 | CP000094           | e-116          | Pseudomonas  | Amino acid adenylation                           | SC1             | -26,72             | ---   | -8,40 |
| MY1003G12 | CP000094           | e-122          | Pseudomonas  | Aminotransferase                                 | SC1             | -3,10              | ---   | -3,58 |
| MY3002B07 | TC58898            | e-53           | Cana         | Dihydropyrimidinase                              | SC1             | -4,17              | ---   | -3,56 |
| MY3005C07 | TC65804            | e-44           | Cana         | Glutaminase                                      | SC1             | ---                | ---   | 2,51  |
| MY4002A11 | CP000094           | e-86           | Pseudomonas  | Imidazolonepropionase                            | SC1             | ---                | -6,41 | ---   |
| MY1003B03 | TC236485           | e-79           | Trigo        | Isovaleryl-CoA Dehydrogenase                     | SC1             | ---                | -3,07 | ---   |
| MY2001C02 | TC47976            | e-107          | Cana         | Methionine synthase                              | SC1             | -4,53              | ---   | -5,13 |
| MY2001C06 | TC67664            | e-113          | Cana         | Tryptophan synthase alpha chain                  | SC1             | -3,61              | -2,41 | -3,39 |
| MY2001B06 | TC66232            | e-110          | Cana         | Ubiquitin thiolesterase otubain-like protein     | SC1             | ---                | ---   | 2,58  |
| MY1001B06 | CP000152           | e-47           | Burkholderia | Aldo/keto reductase                              | SC2             | ---                | ---   | -2,85 |
| MY2008F11 | TC47958            | e-73           | Cana         | Alpha-1,4-glucan-protein synthase                | SC2             | ---                | -2,99 | ---   |
| MY3001E03 | TC57519            | e-53           | Cana         | Arabinoxylan arabinofuranohydrolase isoenzyme    | SC2             | -3,39              | ---   | ---   |
| MY2005H08 | TC48115            | e-79           | Cana         | ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor | SC2             | -9,71              | -3,63 | -4,72 |
| MY2003A12 | TC49715            | e-91           | Cana         | ATP synthase subunit 9 (H(+)-transporting ATP)   | SC2             | 418,77             | ---   | ---   |
| MY3004E06 | TC48736            | e-63           | Cana         | ATP synthase subunit G Vacuolar                  | SC2             | ---                | ---   | 2,87  |
| MY3007C12 | TC57220            | e-73           | Cana         | ATP synthase subunit H Probable vacuolar         | SC2             | ---                | 4,56  | 3,71  |
| MY2001G11 | TC67847            | e-109          | Cana         | Basic blue copper protein                        | SC2             | 3,41               | ---   | ---   |
| MY2008A07 | AE016822           | e-82           | Leifsonia    | Cytochrome C oxidase subunit III                 | SC2             | ---                | ---   | -4,00 |
| MY2009F04 | TC62092            | e-40           | Cana         | Cytochrome c55X precursor                        | SC2             | -4,38              | ---   | -3,48 |
| MY2001E03 | TC70389            | e-115          | Cana         | Cytochrome P450                                  | SC2             | -3,23              | ---   | -3,12 |
| MY2001C10 | TC261031           | e-52           | Rice         | Cytochrome P450 monooxygenase                    | SC2             | ---                | -2,75 | ---   |
| MY2005A03 | TC92020            | e-17           | Milho        | cytochrome P450 monooxygenase                    | SC2             | ---                | -3,18 | ---   |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Quadro 3 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |             | Anotação  | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|-------------|---|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo   |   |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY3001C06 | TC92178            | e-52           | Sorghum     | Cytosolic NADP malic enzyme                     | SC2             | -2,60              | ---   | ---   |
| MY2001D01 | TC91742            | e-98           | Sorghum     | dehydrogenase/acetyl-CoA synthase delta subunit | SC2             | -3,51              | -4,03 | -4,47 |
| MY2005G10 | At4g36750          | e-21           | Arabidopsis | NADPH specific quinone oxidoreductase           | SC2             | -5,43              | -3,05 | -4,47 |
| MY4002B05 | CP000094           | e-114          | Pseudomonas | Oxidoreductase                                  | SC2             | 2,25               | ---   | 2,68  |
| MY2004F02 | TC57261            | e-42           | Cana        | Phosphogluconate dehydrogenase (pdh2)           | SC2             | -3,41              | -3,20 | -3,78 |
| MY2008A08 | AP009048           | e-47           | E. coli     | Predicted regulator of arylsulfatase activity   | SC2             | 3,23               | ---   | ---   |
| MY3008H11 | NP1067393          | e-29           | Aspergillus | Putative NADPH-dependent FMN reductase          | SC2             | ---                | ---   | 3,39  |
| MY2008C04 | TC49384            | e-87           | Cana        | RCc3 protein                                    | SC2             | ---                | ---   | -2,71 |
| MY1003A11 | TC64907            | e-113          | Cana        | Sucrose synthase                                | SC2             | ---                | -3,68 | ---   |
| MY1003F08 | TC65485            | e-112          | Cana        | Uridine kinase-like protein                     | SC2             | -2,64              | ---   | ---   |
| MY3007H11 | TC48111            | e-41           | Cana        | ADP-ribosylation factor                         | SC3             | -3,48              | ---   | ---   |
| MY2004H06 | TC61891            | e-77           | Cana        | Calcium-dependent protein kinase                | SC3             | ---                | ---   | 2,87  |
| MY2008C07 | TC49709            | e-79           | Cana        | DnaJ protein family-like ZMDJ1                  | SC3             | -2,58              | ---   | -2,30 |
| MY2009G03 | TC267282           | e-102          | Rice        | Nodulin-like protein                            | SC3             | -2,36              | ---   | ---   |
| MY2008H09 | TC277460           | e-38           | Rice        | Protein kinase G11A                             | SC3             | -4,50              | ---   | -4,38 |
| MY1001E01 | BI075495           | e-105          | Sorghum     | Protein kinase-like                             | SC3             | ---                | ---   | 2,79  |
| MY4003G04 | TC302687           | e-118          | Milho       | Putative ionotropic glutamate receptor GLR6     | SC3             | 25,11              | 30,91 | 15,67 |
| MY2005A06 | TC66614            | e-105          | Cana        | RAB5A protein                                   | SC3             | ---                | ---   | -3,92 |
| MY2005E05 | TC49312            | e-51           | Cana        | Ras-related protein RIC1                        | SC3             | -3,18              | -3,92 | -4,53 |
| MY2004D03 | TC64668            | e-55           | Cana        | Remorin (pp34)                                  | SC3             | -10,13             | ---   | ---   |
| MY2008E04 | TC52457            | e-63           | Cana        | Serine/threonine protein kinase like protein    | SC3             | ---                | 2,89  | ---   |
| MY1003A02 | TC66453            | e-63           | Cana        | Seven transmembrane helix receptor              | SC3             | ---                | ---   | 2,95  |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique



Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |             | Anotação   | Grupo funcional | Expressão relativa |        |        |
|-----------|--------------------|----------------|-------------|--|-----------------|--------------------|--------|--------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo   |  |                 | M                  | H      | M+H    |
| MY2005D07 | TC65362            | e-111          | Cana        | WNdr1D-like protein kinase                           | SC3             | -2,97              | ---    | ---    |
| MY2009F07 | CP000094           | e-58           | Pseudomonas | Biosynthetic peptidoglycan transglycosylase          | SC4             | ---                | ---    | 2,89   |
| MY2008B05 | TC66307            | e-114          | Cana        | Leaf senescence related protein-like                 | SC4             | ---                | ---    | 2,99   |
| MY3005D08 | TC48039            | e-95           | Cana        | Lipopolysaccharide biosynthesis protein RfaE         | SC4             | -8,06              | -2,97  | -7,62  |
| MY2001E06 | CP000076           | e-16           | Pseudomonas | Lipopolysaccharide biosynthesis protein RfaG         | SC4             | ---                | -2,55  | ---    |
| MY1001D03 | TC310132           | e-77           | Milho       | Membrane protein-like                                | SC4             | ---                | -3,58  | ---    |
| MS1001A02 | TC248191           | e-114          | Rice        | Myosin-like protein                                  | SC4             | -3,01              | ---    | -3,29  |
| MY2008F10 | TC64760            | e-87           | Cana        | Tubulin alpha-1 chain (Alpha-1 tubulin)              | SC4             | -12,38             | ---    | -5,13  |
| MY2005E12 | M60171             | e-77           | Milho       | Tubulin alpha-3 chain (Alpha-3 tubulin)              | SC4             | -2,79              | ---    | -2,81  |
| MY2001F04 | TC64762            | e-51           | Cana        | Tubulin alpha-6 chain (Alpha-6 tubulin)              | SC4             | 2,64               | ---    | ---    |
| MY2008H12 | TC48438            | e-59           | Cana        | Histone H2A  | SC5             | ---                | ---    | -3,14  |
| MY2005H01 | TC48580            | e-73           | Cana        | Histone H2B.4  | SC5             | ---                | -2,83  | ---    |
| MY2009F02 | TC64840            | e-21           | Cana        | Histone H3   | SC5             | -3,29              | ---    | -2,99  |
| MY4002A10 | TC68713            | e-84           | Cana        | Reverse transcriptase like protein                   | SC5             | ---                | -37,79 | ---    |
| MY1003E03 | TC102744           | e-86           | Sorghum     | 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase                   | SC6             | ---                | ---    | 3,20   |
| MY2003G06 | TC66380            | e-78           | Cana        | Esterase D   | SC6             | -2,64              | ---    | -2,50  |
| MY1002B07 | TC68785            | e-71           | Cana        | Lipase-like  | SC6             | ---                | 1897,7 | 471,14 |
| MY2001D12 | TC48691            | e-90           | Cana        | Calnexin   | SC11            | 3,10               | ---    | ---    |
| MY2001H04 | TC65026            | e-86           | Cana        | Elongation factor 1 gamma-like protein               | SC11            | -3,36              | ---    | -3,86  |
| MS1002F07 | TC48573            | e-104          | Cana        | Elongation factor 1-alpha                            | SC11            | -3,25              | -2,60  | -3,68  |
| MY4002E07 | TC48204            | e-105          | Cana        | Elongation factor EF-2                               | SC11            | -3,07              | -2,71  | -3,97  |
| MY1001D04 | TC65808            | e-119          | Cana        | Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3)   | SC11            | ---                | -2,39  | ---    |
| MY1003E06 | TC56539            | e-64           | Cana        | Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) | SC11            | ---                | ---    | -4,17  |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |           | Anotação                                      | Grupo funcional | Expressão relativa |       |        |
|-----------|--------------------|----------------|-----------|---|-----------------|--------------------|-------|--------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo |   |                 | M                  | H     | M+H    |
| MY2003D12 | TC56667            | e-73           | Cana      | Polyubiquitin                                 | SC11            | -6,23              | -5,62 | -31,12 |
| MY2008G07 | TC263571           | e-23           | Rice      | Subtilase activity                            | SC11            | -3,81              | ---   | -3,58  |
| MY4003A04 | TC277679           | e-67           | Rice      | Tetratricopeptide repeat (TPR)                | SC11            | 2,75               | ---   | ---    |
| MY2003F12 | TC57124            | e-91           | Cana      | Ubiquitin-dependent protein catabolism        | SC11            | ---                | ---   | 2,46   |
| MY2008F05 | TC57559            | e-47           | Cana      | Ubiquitin-dependent protein catabolism        | SC11            | -15,03             | ---   | -10,27 |
| MY2005C06 | TC49773            | e-57           | Cana      | 40S ribosomal protein S23                     | SC12            | -5,78              | -3,25 | -5,21  |
| MY2003G01 | TC48886            | e-71           | Rice      | 60S ribosomal protein                         | SC12            | ---                | 2,73  | 2,97   |
| MY2003H06 | TC66691            | e-107          | Cana      | 60S ribosomal protein L35-3                   | SC12            | 2,20               | ---   | ---    |
| MY2001A03 | TC307179           | e-57           | Milho     | BTB/POZ domain                                | SC12            | -5,06              | ---   | -4,38  |
| MY2001D05 | TC67700            | e-42           | Cana      | Chromdomain-containing protein CRD101         | SC12            | ---                | 2,53  | 3,25   |
| MY2003A05 | TC68633            | e-70           | Cana      | DNA-binding protein (Hexamer-binding protein) | SC12            | -3,27              | ---   | -4,29  |
| MY2005F07 | TC67267            | e-93           | Cana      | DNA-binding protein-like                      | SC12            | -6,73              | ---   | -5,50  |
| MY2003E12 | TC52149            | e-63           | Cana      | DNA-binding protein-like                      | SC12            | -3,32              | ---   | -2,85  |
| MS1001G10 | TC56427            | e-21           | Rice      | Endonuclease                                  | SC12            | 13,18              | ---   | ---    |
| MY2005G12 | TC64983            | e-64           | Cana      | Homeodomain leucine zipper protein            | SC12            | -4,69              | -3,16 | -4,00  |
| MY3002C10 | TC56708            | e-99           | Cana      | MADS box protein 1                            | SC12            | -6,36              | -2,85 | -4,29  |
| MY4003A05 | TC66942            | e-74           | Cana      | Nuclear poly(A) polymerase                    | SC12            | 3,81               | ---   | ---    |
| MY3005F09 | TC50013            | e-78           | Cana      | Nucleotidyltransferase activity               | SC12            | ---                | 5,35  | 3,46   |
| MY2004B05 | TC65238            | e-49           | Cana      | Ocs-element binding factor 1 (OCSBF-1)        | SC12            | -4,41              | -2,85 | -3,81  |
| MY1003G04 | TC64825            | e-74           | Cana      | Poly(A)-binding protein                       | SC12            | -5,94              | -2,58 | -3,20  |
| MY3003C06 | TC52470            | e-98           | Cana      | Poly(A)-binding protein                       | SC12            | ---                | 2,79  | ---    |
| MY2003C10 | TC49271            | e-62           | Cana      | Pre-mRNA splicing factor                      | SC12            | ---                | -3,12 | -3,29  |
| MY2004H04 | TC306340           | e-115          | Milho     | Putative bHLH transcription protein           | SC12            | -3,12              | ---   | -2,93  |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |              | Anotação                                       | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|--------------|--|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo    |  |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY1002C07 | BX640423           | e-73           | Bordetella   | Putative phosphohydrolase                      | SC12            | ---                | ---   | 3,53  |
| MY2005B08 | TC49165            | e-97           | Cana         | RNA binding protein Rp120                      | SC12            | ---                | -2,71 | ---   |
| MY2005F03 | TC68869            | e-105          | Cana         | RRM RNA binding protein GRY-RBP                | SC12            | -2,85              | ---   | ---   |
| MY4003C02 | TC49727            | e-111          | Cana         | Scarecrow-like protein                         | SC12            | 2,33               | 2,62  | ---   |
| MY3006A08 | TC65823            | e-61           | Cana         | spliceosome assembly                           | SC12            | -8,34              | -2,83 | -4,23 |
| MY2005H03 | TC53600            | 0,017          | Cana         | transcription factor                           | SC12            | -3,34              | ---   | -2,73 |
| MY3008D09 | TC8664             | e-49           | Aspergillus  | transcription factor Sp1                       | SC12            | 6,96               | ---   | ---   |
| MY2004C02 | TC293926           | e-133          | Milho        | Transcription factor WRKY32                    | SC12            | -3,20              | ---   | -3,16 |
| MY1001D08 | CP000094           | e-59           | Pseudomonas  | Transcriptional Regulator, LysR family         | SC12            | ---                | ---   | 2,87  |
| MY2005D08 | TC68205            | e-64           | Cana         | U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein          | SC12            | -3,05              | ---   | -2,57 |
| MY2004G01 | TC51038            | e-74           | Cana         | WD-40 repeat protein                           | SC12            | ---                | ---   | 3,03  |
| MY2005D04 | TC246746           | e-27           | Milho        | WD-repeat protein RBAP1                        | SC12            | ---                | ---   | -3,68 |
| MY1003E10 | TC60513            | e-108          | Cana         | Zinc knuckle domain-like                       | SC12            | -3,71              | -3,10 | -4,08 |
| MY4003G02 | TC50367            | e-57           | Cana         | Carbohydrate kinase, PfkB family               | SC13            | -4,89              | -3,12 | -7,31 |
| MY3008D11 | TC48432            | e-26           | Cana         | Cystathionine gamma-synthase                   | SC13            | ---                | 2,89  | ---   |
| MY2001B07 | CP000152           | e-119          | Burkholderia | Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme | SC13            | 2,73               | ---   | ---   |
| MY1003A03 | CP000076           | e-62           | Pseudomonas  | Muconate cycloisomerase                        | SC13            | -3,23              | -2,55 | -2,33 |
| MY2009A02 | TC64952            | e-66           | Cana         | Caffeic acid 3-O-methyltransferase             | SC15            | -2,85              | -3,89 | ---   |
| MY3006H06 | TC56927            | e-34           | Cana         | Catalase isozyme 3                             | SC15            | 2,99               | ---   | ---   |
| MY3003C03 | TC103120           | e-79           | Trigo        | Chitinase III-like protein                     | SC15            | -8,40              | ---   | -7,16 |
| MY1001B04 | TC306521           | e-37           | Milho        | Coclaurine N-methyltransferase                 | SC15            | ---                | ---   | 2,91  |
| MY2003D04 | TC48477            | e-121          | Cana         | Cysteine proteinase 1 precursor                | SC15            | -3,16              | ---   | -3,63 |
| MY2004E01 | TC48477            | e-62           | Cana         | Cysteine proteinase 1 precursor                | SC15            | ---                | -3,71 | -4,26 |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |             | Anotação                                    | Grupo funcional | Expressão relativa |        |        |
|-----------|--------------------|----------------|-------------|---|-----------------|--------------------|--------|--------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo   |   |                 | M                  | H      | M+H    |
| MY2004H11 | TC305001           | e-32           | Milho       | Cytosolic ascorbate peroxidase              | SC15            | ---                | -4,59  | -3,46  |
| MY4003H05 | CP000058           | e-104          | Pseudomonas | Filamentous hemagglutinin                   | SC15            | 2574,0             | 129,79 | 138,14 |
| MY2003B05 | TC65234            | e-101          | Cana        | Germin-like protein 4                       | SC15            | 2,71               | ---    | 3,36   |
| MY2005A08 | TC65234            | e-66           | Cana        | Germin-like protein 4                       | SC15            | ---                | ---    | -3,89  |
| MY2005B05 | TC48076            | e-84           | Cana        | Glutathione peroxidase-like protein         | SC15            | ---                | -3,71  | -5,06  |
| MY2001G03 | TC261289           | e-48           | Rice        | Heat shock protein 82                       | SC15            | -4,63              | -3,58  | -4,76  |
| MY2001E01 | TC310995           | e-93           | Milho       | Heat shock protein, mitochondrial precursor | SC15            | -3,71              | ---    | -3,14  |
| MY2004G07 | TC67074            | e-71           | Cana        | Hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP)     | SC15            | 2,33               | ---    | ---    |
| MY2001B01 | TC259117           | e-100          | Rice        | Jacalin-like lectin domain                  | SC15            | 3,27               | ---    | ---    |
| MY2001G12 | TC47985            | e-79           | Cana        | Metallothionein-like protein 1 (MT-1)       | SC15            | 74,54              | ---    | ---    |
| MY2003C08 | TC48237            | e-62           | Cana        | Metallothionein-like protein 1 (MT-1)       | SC15            | ---                | ---    | 3,43   |
| MY2005D05 | TC48237            | e-19           | Cana        | Metallothionein-like protein 1 (MT-1)       | SC15            | -3,10              | -3,36  | -3,56  |
| MS1008F10 | TC48218            | e-75           | Cana        | Metallothionein-like protein type 1         | SC15            | ---                | -3,56  | -4,76  |
| MY2001A12 | TC57181            | e-113          | Cana        | Metallothionein-like protein type 3 (MT-3)  | SC15            | 2,79               | -2,79  | ---    |
| MY2005B03 | TC48900            | e-77           | Cana        | Nematode resistance protein-like protein    | SC15            | -3,58              | -4,50  | -6,19  |
| MY2003A07 | CD208536           | e-88           | Sorghum     | O-methyltransferase ZRP4 (OMT)              | SC15            | ---                | 3,16   | 3,41   |
| MY1001F02 | TC64948            | e-56           | Cana        | Osr40c1 protein                             | SC15            | 2,64               | ---    | ---    |
| MY3004A06 | TC65258            | e-52           | Cana        | Pathogenesis-related protein-like protein   | SC15            | ---                | 2,77   | 2,77   |
| MY3008F12 | TC56332            | e-53           | Cana        | Profilin 5 (ZmPRO5)                         | SC15            | ---                | ---    | 3,25   |
| MY3004E05 | TC48005            | e-126          | Cana        | S-adenosylmethionine synthetase             | SC15            | -4,82              | -2,75  | -4,56  |
| MY1002C06 | CP000094           | e-130          | Pseudomonas | Signal transduction histidine kinase        | SC15            | -4,63              | ---    | -8,51  |
| MY1003B08 | CP000094           | e-107          | Pseudomonas | VacJ-like lipoprotein                       | SC15            | ---                | ---    | -3,58  |
| MY2005D02 | TC56921            | e-56           | Cana        | Vacuolar aspartic proteinase, prophytepsin  | SC15            | -3,01              | -4,38  | -5,03  |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |                | Anotação   | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|--|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo      |  |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY2008E01 | TC56763            | e-48           | Cana           | Wali7 protein                                      | SC15            | -21,11             | ---   | -9,38 |
| MY2004F12 | AT5G60790          | e-63           | Populus niagra | ABC family protein                                 | SC16            | 6,11               | ---   | ---   |
| MY2008F07 | TC64879            | e-99           | Cana           | ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial precursor | SC16            | ---                | ---   | -3,46 |
| MY2001F03 | CP000076           | e-64           | Pseudomonas    | Cation transporter, putative                       | SC16            | -3,94              | -3,16 | -4,06 |
| MY3004H12 | TC60473            | e-32           | Cana           | Clathrin assembly protein AP17-like protein        | SC16            | -5,78              | ---   | -4,86 |
| MY1001E09 | CP000076           | e-75           | Pseudomonas    | Gluconate transporter family protein               | SC16            | ---                | -2,75 | -2,31 |
| MY1002D01 | CP000152           | e-102          | Burkholderia   | Major facilitator superfamily (MFS_1) transporter  | SC16            | ---                | ---   | 3,07  |
| MY1001B11 | CP000076           | e-53           | Pseudomonas    | MFS permease-like protein                          | SC16            | ---                | ---   | -2,85 |
| MY2008H05 | TC51700            | e-48           | Cana           | Transport protein SEC61 gamma subunit              | SC16            | -4,59              | ---   | -3,56 |
| MY4002A06 | BX640431           | e-87           | Bordetella     | Putative exported protein                          | SC16            | 6,06               | ---   | 2,64  |
| MY3008F09 | BX640451           | e-51           | Bordetella     | Putative oligopeptide transport ATP-binding        | SC16            | -5,06              | -2,87 | -4,23 |
| MY3008B08 | CP000094           | e-33           | Pseudomonas    | SecA protein                                       | SC16            | ---                | ---   | 2,75  |
| MY3008H05 | TC293085           | e-78           | Milho          | Sugar ABC transporter, permease protein            | SC16            | -3,20              | ---   | ---   |
| MY2009D10 | TC56409            | e-57           | Cana           | Tonoplast intrinsic protein                        | SC16            | 2,55               | ---   | 2,36  |
| MY3008B10 | CP000075           | e-92           | Pseudomonas    | Zinc-containing alcohol dehydrogenase              | SC17            | 2,89               | ---   | 2,57  |
| MY2001E05 | AF237701           | e-69           | Pseudomonas    | Unknown protein                                    | SC18            | -3,51              | -3,63 | -4,69 |
| MY2004H07 | TC49502            | e-54           | Cana           | Unknown protein                                    | SC18            | ---                | ---   | 2,91  |
| MY2008D09 | TC58721            | e-89           | cana           | Unknown protein                                    | SC18            | -2,77              | -3,05 | ---   |
| MY3006B02 | TC65286            | e-81           | cana           | Unknown protein                                    | SC18            | 2,66               | ---   | ---   |
| MY2001E02 | TC96677            | e-43           | sorghum        | Unknown protein                                    | SC18            | 3,43               | ---   | ---   |
| MY2001B08 | TC58980            | 0,048          | Cana           | Unknown protein                                    | SC18            | -3,25              | ---   | -3,34 |
| MY4002F02 | TC94065            | e-75           | sorghum        | Unknown protein                                    | SC18            | ---                | -2,46 | ---   |
| MY2008D06 | TC49205            | e-101          | Cana           | Unknown protein                                    | SC18            | -2,81              | -2,60 | ---   |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Continuação)

| Cluster   | Maior similaridade |                |            | Anotação        | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo  |                 |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY2003H01 | TC65503            | e-55           | Cana       | Unknown protein | SC18            | 30,91              | ---   | 3,20  |
| MY2003A01 | TC49939            | e-58           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -2,93              | ---   | ---   |
| MY2001D11 | TC48493            | e-57           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -3,20              | ---   | -4,66 |
| MY2008A11 | TC48493            | e-101          | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | -3,18 | -3,46 |
| MY1001B03 | TC60979            | e-51           | Cana       | Unknown protein | SC18            | 3,41               | ---   | ---   |
| MY2005C07 | TC50953            | e-26           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 3,07  |
| MY3003B06 | TC305575           | e-67           | Milho      | Unknown protein | SC18            | ---                | 3,01  | ---   |
| MY4003B05 | TC282846           | e-72           | Milho      | Unknown protein | SC18            | ---                | 2,85  | ---   |
| MY4003E02 | TC51297            | e-38           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,73  |
| MY2008C05 | TC56942            | e-106          | Cana       | Unknown protein | SC18            | -3,76              | -3,56 | ---   |
| MY2008B06 | TC49304            | e-12           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -3,07              | ---   | -4,47 |
| MY3003A12 | TC267392           | e-30           | Rice       | Unknown protein | SC18            | -4,69              | -2,93 | -2,71 |
| MY1002B02 | BX640452           | e-34           | Bordetella | Unknown protein | SC18            | ---                | -2,60 | -2,69 |
| MY2005G02 | TC313850           | e-6            | Milho      | Unknown protein | SC18            | -4,26              | ---   | ---   |
| MY4002A02 | TC255444           | e-46           | Rice       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 3,43  |
| MS1008A04 | TC260862           | e-21           | Rice       | Unknown protein | SC18            | 21,11              | -4,29 | ---   |
| MY3003F08 | TC59647            | e-63           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -5,24              | -3,16 | -5,58 |
| MY2008G01 | TC50285            | e-105          | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | -2,85 | -3,20 |
| MY2008C08 | TC48842            | e-52           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -4,96              | -3,78 | -4,66 |
| MY2001B03 | TC57488            | e-63           | Cana       | Unknown protein | SC18            | 2,95               | ---   | ---   |
| MY2001H02 | XM_385124          | e-109          | Gibberella | Unknown protein | SC18            | -6,11              | -3,48 | -4,92 |
| MY2003B08 | XM_391225          | e-47           | Gibberella | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,71  |
| MY2005E01 | AP009048           | e-82           | E. coli    | Unknown protein | SC18            | -2,77              | ---   | -3,10 |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

Tabela 2 – Genes com expressão diferencial em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* (M), não-inoculadas e cultivadas em solo com Imazapique (I) e colonizadas por *G. clarum* e tratadas com Imazapique (M + I)

(Conclusão)

| Cluster   | Maior similaridade |                |            | Anotação        | Grupo funcional | Expressão relativa |       |       |
|-----------|--------------------|----------------|------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------|-------|
|           | Acesso             | Expected Value | Organismo  |                 |                 | M                  | H     | M+H   |
| MY2004A02 | NP623862           | e-107          | Neurospora | Unknown protein | SC18            | -4,86              | ---   | -2,62 |
| MY2003G04 | TC65897            | e-78           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -8,75              | -2,64 | -4,26 |
| MY3005D02 | TC289363           | e-25           | Milho      | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,66  |
| MY1003F05 | TC57921            | e-68           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 3,66  |
| MY2005E07 | TC50814            | e-55           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -2,43              | -2,85 | ---   |
| MY2008B01 | TC65972            | e-67           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | 2,71  | ---   |
| MY1003G07 | TC70270            | e-94           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 3,23  |
| MY1002H06 | TC67094            | e-90           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,66  |
| MY2003H09 | TC67800            | e-87           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | -2,55 |
| MY2003D01 | TC49174            | e-65           | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,66  |
| MY2008F12 | TC306804           | e-83           | Milho      | Unknown protein | SC18            | -3,16              | ---   | -3,84 |
| MY2001A01 | CA200189           | e-30           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -4,26              | ---   | -4,26 |
| MY2004C11 | CA264863           | e-55           | Cana       | Unknown protein | SC18            | -5,54              | ---   | -3,39 |
| MY3004D03 | TC58929            | e-124          | Cana       | Unknown protein | SC18            | ---                | ---   | 2,77  |
| MS1002D02 | TC56427            | e-23           | Rattus     | Unknown protein | SC18            | 8,94               | ---   | ---   |
| MS1008C06 | TC56427            | e-27           | Homo       | Unknown protein | SC18            | 25180              | ---   | ---   |
| MY2004E09 | TC91983            | e-23           | Rice       | Unknown protein | SC18            | ---                | -4,03 | -3,34 |
| MS1008D03 | TC260866           | e-21           | Rattus     | Unknown protein | SC18            | 86,22              | ---   | ---   |

Nota – A expressão relativa de M foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa de I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique; a expressão relativa de M + I foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique

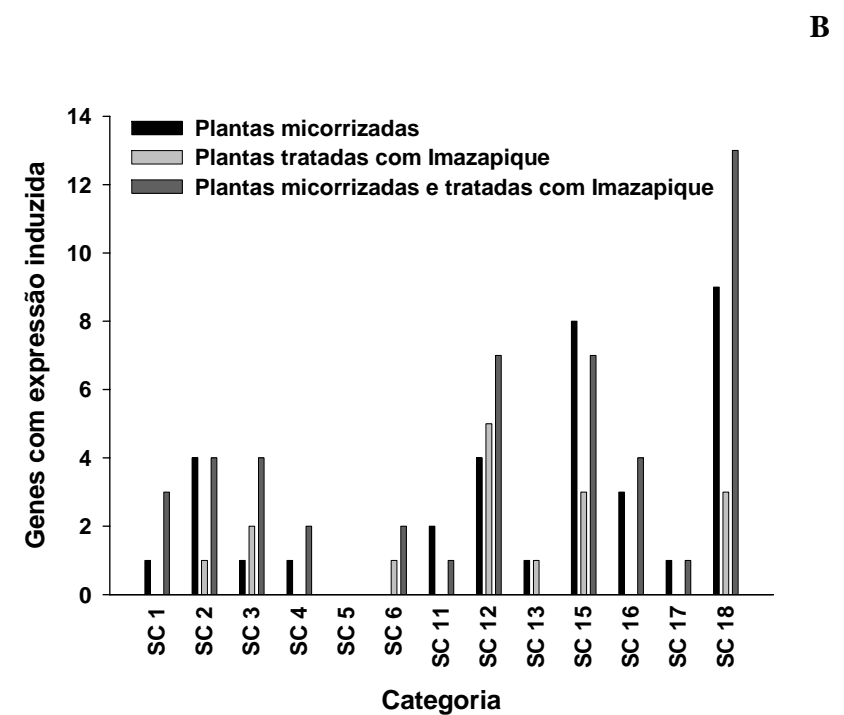
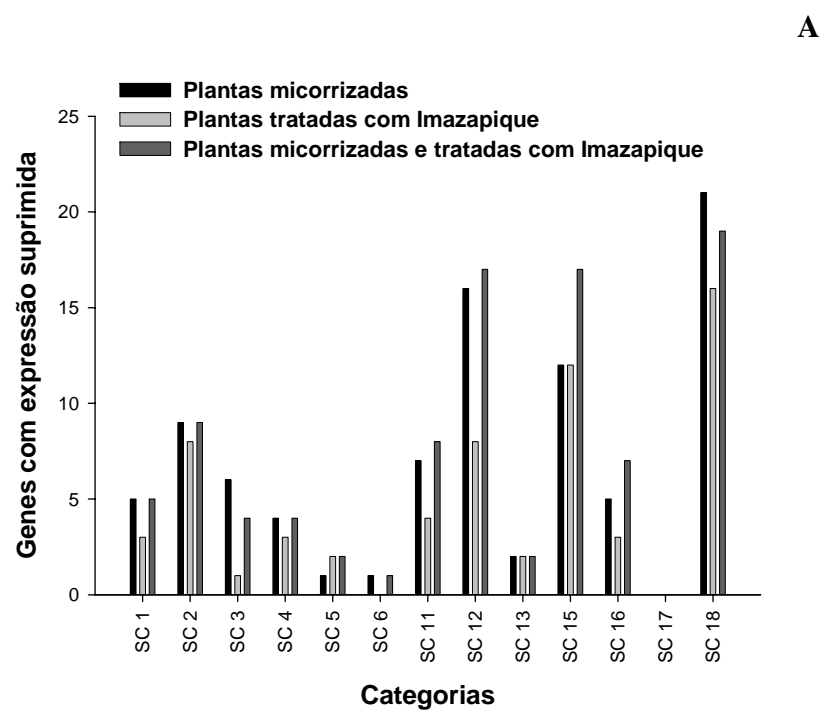


Figura 4 – Número de genes com expressão diferencial por categoria funcional (**A** – genes suprimidos; **B** – genes induzidos). A expressão relativa das plantas micorrizadas foi determinada em função do controle não-inoculado; a expressão relativa das plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique foi determinada em função do controle sem Imazapique; a expressão relativa das plantas micorrizadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique foi determinada em função do controle não-inoculado e sem Imazapique



A análise estatística revelou que dos 384 genes analisados, 207 (54%) apresentaram expressão diferencial significativa ao nível de 5% de probabilidade (tabela 2). Destes, 126 genes (60%) tiveram expressão diferencial em plantas micorrizadas, dos quais 36 (28%) foram induzidos e 90 (72%) foram suprimidos na presença de *G. clarum*. As plantas que receberam Imazapique na concentração recomendada para solo arenoso (30,8mg de i.a. kg<sup>-1</sup> de solo) apresentaram 79 genes (38%) com expressão diferencial, dos quais 16 (20%) foram induzidos e 63 (80%) foram suprimidos. Já as plantas micorrizadas e tratadas com Imazapique apresentaram 143 genes (68%) diferencialmente expressos, dos quais 48 (33%) foram induzidos e 95 (67%) foram suprimidos. A frequência relativa dos genes com expressão diferencial em cada categoria funcional estão apresentadas na Figura 4.

Os genes de plantas micorrizadas que apresentaram maior índice de supressão (>10 vezes) em relação ao controle não-inoculado foram similares a: adenilação de amino-ácido, Wali7, proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, tubulina  $\alpha$ -1 e remorina; já, os que apresentaram maior índice de indução (> 400 vezes) foram similares a: ATP sintase, adenilação de amino-ácido, hemaglutinina e função desconhecida.

Nas plantas cultivadas em solo tratado com Imazapique, os genes que apresentaram maior índice de supressão (> 5 vezes) em relação às plantas sem herbicida foram similares a: transcritase reversa, imidazolonepropionase e poliubiquitina; já, os que apresentaram maior índice de indução (> 30 vezes) foram similares a: receptor de glutamato, hemaglutinina e lipase.

Os genes codificando as proteínas: poliubiquitina, proteína de catabolismo dependente de ubiquitina, wali7 e quinase de histidina envolvida em transdução de sinal foram os mais suprimidos (> 8 vezes) em plantas micorrizadas cultivadas em solo tratado com Imazapique em relação ao controle não-inoculado e sem herbicida; já os genes similares a: receptor de glutamato, adenilação de aminoácido, hemaglutinina e lípase foram os mais induzidos (> 15 vezes) neste mesmo tratamento.

### 3.5 Discussão dos resultados

Embora o número de genes suprimidos nos três tratamentos tenha sido maior, os genes que foram induzidos apresentaram maior intensidade de indução (número de vezes induzidos).

O elevado número de genes pertencentes às classes SC12 (metabolismo de RNA e transcrição) e SC15 (resposta a estresses), com expressão diferencial ( $P < 0,05$ ) em raízes de cana-

de-açúcar colonizadas por *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado, sugere que programas genéticos específicos são necessários para o desenvolvimento das micorrizas arbusculares.

### 3.5.1 Metabolismo de RNA e transcrição

Dos 50 genes associados ao metabolismo de RNA e transcrição (SC12) avaliados nos macroarranjos de cDNA, 20 tiveram seu nível de expressão alterado em função da inoculação com *G. clarum*, 13 em função da aplicação de Imazapique e 24 em função da inoculação do FMA combinado à aplicação de Imazapique. A maioria destes genes apresentaram supressão no acúmulo de transcritos em relação ao controle, tanto em plantas micorrizadas quanto em plantas micorrizadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique.

Este é o caso do gene MY2005G12, cujo acúmulo de transcritos foi suprimido aproximadamente 4 vezes em raízes micorrizadas e/ou cultivadas em solo tratado com herbicida. Este gene codifica uma proteína com homeodomínio zipper de leucina (HD-Zip) e atua como reguladora no desenvolvimento de tecidos e órgãos (ZHONG; YE 1999; BAIMA; POSSENTI; MATTEUCCI, 2001; DICRISTINA; SESSA; DOLAN, 1996), assim como na defesa contra patógenos (MAYDA et al. 1999; ZHOU et al., 2001) e em resposta adaptativa às condições ambientais, tanto promovidas por fatores estressantes abióticos como bióticos (YU et al., 2005; SÖDERMAN; MATTSSON; ENGSTROEM, 1996; LEE; CHUN, 1998).

Outro gene da família zipper de leucina (bZip) que teve o acúmulo de transcritos suprimido em aproximadamente 4 vezes em raízes micorrizadas e/ou cultivadas em solo tratado com herbicida foi o gene MY2004B05. Este gene codifica a proteína OCSBF-1, a qual liga-se aos elementos de síntese do octopine (Ocs). OCSBF-1 é diferencialmente expresso durante o desenvolvimento de folhas de milho (VINSON; SIGLER; MCKNIGHT, 1989). Possivelmente OCSBF-1 atua como componente necessário ao desenvolvimento da folha (SINGH et al., 1990).

A supressão destes genes também foi observada em menor intensidade (3 vezes, aproximadamente) em plantas não-inoculadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique. Imazapique atua diretamente no desenvolvimento da planta, inibindo o crescimento pelo bloqueio da biosíntese de aminoácidos essenciais (Isoleucina, Leucina e Valina). A supressão destes genes em plantas micorrizadas reforça a teoria que os fungos são capazes de alterar o programa transcricional da planta, provavelmente reduzindo o crescimento das raízes.

O gene MY4003C02 teve sua expressão induzida (aproximadamente 3 vezes) tanto em plantas micorrizadas quanto em plantas não micorrizadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique. Estes genes codifica a proteína “Scarecrow”, pertencente à família dos fatores de transcrição GRAS. A proteína “Scarecrow” é uma das proteínas responsáveis pela manutenção e organização do centro quiescente (QC) presente na parte basal das raízes, onde participa juntamente com a auxina regulando o direcionamento do crescimento radicular (SABATINI et al., 2003). Novamente, a alteração da expressão gênica ocorrendo nestes dois tratamentos demonstra uma possível sobreposição da regulação dos genes envolvidos no desenvolvimento da planta.

### 3.5.2 Genes envolvidos no sistema de defesa

Dos 40 genes relacionados a resposta à estresses (SC15) avaliados nas membranas de macroarranjos, 20 tiveram seu nível de expressão alterado em função da inoculação com *G. clarum*, 15 em função da aplicação de Imazapique e 24 em função da inoculação do FMA combinado à aplicação de Imazapique. A maioria destes apresentaram supressão em função dos tratamentos.

A explosão oxidativa é uma das armas mais poderosas que as plantas possuem para a defesa contra o ataque de patógenos. Nas interações planta-patógeno, o desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade (RH) está associado com a explosão oxidativa gerando espécies ativas de oxigênio (EAOs), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (LOW; MERIDA, 1996; MEHDY, 1994). O peróxido de hidrogênio podem atuar como molécula sinal nas plantas, desencadeando respostas de defesa, como a indução sistêmica de genes de defesa, a morte celular programada das células elicitadas e o reforço da parede celular. (DANGL, DIETRICH, RICHBERG, 1996; LIN; YANG, 1997; PARK et al., 1998). O mecanismo de destoxificação das EAOs, começa com a indução de diferentes enzimas como superóxido dismutase (SOD) e catalases (CATs) (MITTLER et al., 2004).

Em nosso experimento houve expressão diferencial de dois genes codificando germinas. Um deles (MY2003B05) apresentou indução, aproximadamente 3 vezes, no acúmulo de transcritos em raízes colonizadas por *G. clarum* e/ou em plantas cultivadas com solo tratado com Imazapique, comparado aos controles não-micorrizados e/ou cultivados sem herbicida. A proteína germina é constituída de uma ampla e diversificada família de proteínas em plantas,

participando em inúmeros processos de importância para o desenvolvimento da planta e ativação do sistema de defesa (BERNIER; BERNA 2001). Análise cristalográfica e bioquímica desta proteína evidenciaram a atividade enzimática bifuncional, possuindo atividade de oxilato oxidase e de SOD (WOO et al., 2000).

Resultados similares foram obtidos por Doll et al. (2003), os quais constataram aumento no número de transcritos do gene *MtGlp1* codificando germina em raízes de *M. truncatula* quando colonizada por *G. intraradices* e por Lambais, Rios-Ruiz e Andrade (2003), os quais verificaram aumento na atividade de SOD em raízes de feijão quando colonizadas por *G. clarum*. SOD participa no processo de destoxificação de EAOs, convertendo  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . A indução deste gene pode explicar a atuação do fungo micorrízico atenuando ou até mesmo inibindo a ativação do sistema de defesa na planta.

Outro gene envolvido no mecanismo de destoxificação das EAOs é a catalase. O gene (MY3006H06) codificando uma catalase, foi induzido 3 vezes em plantas inoculadas com *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado. Lambais, Rios-Ruiz e Andrade (2003) também observaram aumento da atividade de CATs em raízes de feijão colonizadas por *G. clarum*. O aumento da atividade das CATs pode estar atenuando a resposta de defesa da planta, facilitando o crescimento intrarradicular do fungo e o desenvolvimento das MAs.

Enzimas proteolíticas são conhecidas por estarem associadas com o desenvolvimento da morte celular programada (MCP). Em nosso experimento, dois genes MY2003D04 e MY2005D02 codificando uma proteinase de cisteína e uma proteinase aspártica apresentaram diminuição no acúmulo de transcritos de aproximadamente 3 vezes em plantas micorrizadas quando comparado ao controle não-inoculadas. Foi verificado aumento no número de transcritos do gene codificando a proteinase de cisteína na senescência dos nódulos de ervilha e de soja (KARDAILSKY; BREWIN, 1996; ALESANDRINI et al., 2003), nas interações planta-patógenos compatíveis (D'SILVA et al., 1998), em condições ambientais de estresses (KOIZUMI et al., 1993) e em resposta ao estresse oxidativo (SOLOMON et al. 1999). A proteinase aspártica é ativada na degeneração nuclear após a polinização (CHEN; FOOLAD, 1997). O papel preciso das proteinases na MCP ainda não é conhecido (BEERS; WOFFENDEN; ZHAO, 2000), mas provavelmente a presença do FMA atue amenizando a ativação dos mecanismos que induzem a MCP.

Várias reações bioquímicas que ocorrem em plantas envolvem a transferência do grupo metil. Em nosso experimento, a expressão dos genes MY2009A02 e MY3004E05 codificando o ácido cafeico 3-*O*-metiltransferase (COMT) e S-adenosyl-L-methionine sintase (SAMS), foram suprimidos em 2,85 e 4,82 vezes em plantas micorrizadas, comparado ao controle não-micorrizada, respectivamente. COMT e SAM atuam em diversos tipos de substrato (ZUBIETA et al., 2002; MOFFATT; WERETILNYKB, 2001), dentre eles, moléculas envolvidas na biosíntese de fitoalexinas e de lignina (KOTA, et al., 2004; LIN et al., 2006). A via biossintética de fitoalexinas envolve uma série de enzimas que podem ser reguladas na transcrição por estímulos bióticos e abióticos (Dixon & Harrison, 1990). Em interações planta-patógeno incompatíveis, normalmente ocorre um acúmulo localizado de fitoalexinas no sítio de infecção e em suas imediações, com conseqüente morte das células do hospedeiro e do patógeno (YANG; TRINH; IMAI, 2004).

A diminuição no acúmulo dos transcritos envolvidos na metilação de proteínas que ocorre em plantas inoculadas com *G. clarum* pode indicar o papel do fungo atenuando o acionamento do sistema de defesa da planta, facilitando assim a colonização intrarradicular. A presença de Imazapique não alterou a quantidade de transcritos acumulados de SAMS em plantas micorrizadas.

Outro gene envolvido diretamente no sistema de defesa, é o gene MY2001A03, o qual foi suprimido em 5 vezes em plantas micorrizadas quando comparado à plantas não-micorrizadas. Este gene codifica uma proteína com domínio BTB/POZ. O domínio BTB modula a interação proteína-proteína (COLLINS; STONE; WILLIAMS, 2001) e participa na regulação da biosíntese do etileno (WANG et al., 2004). O etileno participa ativando a síntese de enzimas hidrolíticas, como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanases, as quais podem inibir o desenvolvimento do fungo micorrízico. O controle da síntese de etileno pelo fungo seria fundamental para atenuar as respostas de defesa na planta.

As hidrolase com atribuições de quitinase também participam no sistema de defesa da planta e são induzidas durante a infecção de plantas por microrganismos patogênicos (BOLLER, 1987; COLLINGE et al., 1993). Em nosso experimento o gene (MY3003C03), codificando uma quitinase do tipo III, apresentou supressão de acúmulo de transcritos em aproximadamente 8 vezes em raízes micorrizadas, comparado ao controle não-inoculado. Normalmente, quitinases apresentam indução transitória em raízes micorrizadas, seguida de supressão a níveis abaixo dos

encontrados em plantas não-inoculadas (SPANU, et al., 1989; VOLPIN et al., 1994; LAMBAIS; MEHDY, 1993). Em experimentos *in vitro*, quitinases hidrolisam parcialmente a parede celular fúngica, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos (BOLLER et al., 1983; SCHLUMBAUM et al., 1986).

Dos 12 genes relacionados ao sistema de defesa da planta (SC15), 7 tiveram a expressão suprimida em plantas inoculadas com *G. clarum*, em relação ao controle não-inoculado, sugerindo que a supressão do sistema de defesa da planta é essencial para o desenvolvimento das MAs. Essa supressão não foi afetada pela presença de Imazapique.

### 3.5.3 Genes relacionados a resposta à estresses

Dois genes (MY2001G03 e MY2001E01), codificando proteínas relacionadas com choque térmico, apresentaram expressão suprimida em torno de 4 vezes, tanto em plantas inoculadas com *G. clarum*, quanto em plantas inoculadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique, quando comparado com o controle não-inoculado e/ou sem herbicida. Proteínas relacionadas a choque térmico são proteínas auxiliares (chaperonas) induzidas por vários tipos de estresses (LIU et al., 2003), porém as vias em que essas proteínas atuam ainda é desconhecida.

A expressão do gene MY1001F02, codificando a proteína *osr40c1* foi induzida em mais de 2 vezes nas plantas micorrizadas, quando comparado ao controle, não-inoculado. Moons et al. (1997) observaram um aumento transiente no nível de transcritos de *osr40c1* em raízes de plântulas tratadas com ácido abscísico (ABA) e choque osmótico. Segundo os autores, *osr40c1* participa ativamente na resposta adaptativa da raiz a ambientes hiper-osmóticos e que provavelmente possui função estrutural nas raízes das plantas, já que não foi observado aumento de acúmulo de transcritos nos tecidos superiores das plantas.

O gene *Wali7* é normalmente induzido em condições de estresse associada à presença de alumínio (Al) no solo (RICHARDS; SNOWDEN; CARDNER, 1994). Em nosso experimento a expressão do gene (MY2008E01) codificando a proteína *wali7* foi suprimida 21 vezes em plantas micorrizadas, comparado às plantas não-micorrizadas. Plantas inoculadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique apresentaram supressão menor (9,38 vezes), quando comparado ao tratamento controle. É possível que *Wali7* responda à deficiência de P que ocorre em condições de alta concentração de Al no solo, e que o FMA tenha aliviado o estresse causado por baixa concentração de P.

### 3.5.4 Genes relacionados a dinâmica celular

Três genes codificando tubulinas e uma miosina foram expressos diferencialmente em plantas micorrizadas ( $p < 0,05$ ). Essas proteínas interagem com as proteínas do citoesqueleto permitindo a movimento das organelas nas células (CARNEIRO; HUGHES; LARKINS, 1999). O gene MY2008F10, codificando a proteína tubulina  $\alpha$ -1 foi suprimido em aproximadamente 12 e 5 vezes nas plantas micorrizadas e nas plantas micorrizadas e cultivadas em solo tratado com herbicida, comparado aos controles, respectivamente. As tubulinas possivelmente estão associadas aos rearranjos do citoesqueleto atuando na amarração dos microtúbulos (DURSO; CYR, 1994). Pelo menos uma das proteínas envolvidas na movimentação das organelas da planta foi influenciada pela presença de Imazapique no meio, indicando que o herbicida pode alterar o rearranjo dos micotúbulos, dificultando o desenvolvimento da simbiose.

### 3.6 Conclusões

- A alteração no perfil de transcritos em raízes micorrizadas de cana-de-açúcar demonstra que a simbiose micorrízica é um processo complexo que envolve a reprogramação genética da planta;
- Os FMAs controlam alguns dos genes relacionados aos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento da planta;
- O herbicida Imazapique altera o perfil de transcritos em raízes micorrizadas, porém nos genes relacionados ao sistema de defesa da planta essa alteração não foi observada;
- A maioria dos genes expressos diferencialmente foram suprimidos tanto em plantas micorrizadas cultivadas na ausência de Imazapique, quanto em plantas micorrizadas e cultivadas em solo tratado com Imazapique.

### Referências

ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERLAVAGE, A. R.; McCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, Jun, 1991.

ALESANDRINI, F.; MATHIS, R.; SYPE, G. van de; HEROUART, D.; PUPPO, A. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. **New phytologist**, Oxford – UK, v. 158, n. 1, p. 131-138, Apr. 2003.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 5350-5354, 1977.

ANE, J. M.; KISS, G. B.; RIELY, B. K.; PENMETS, R. V.; OLDROYD, G. E. D.; AYAX, C.; LEVY, J.; DEBELLE, F.; BAEK, J. M.; KALO, P.; ROSENBERG, C.; ROE, B. A.; LONG, S. R.; DENARIE, J.; COOK, D. R. Medicago truncatula *DMII* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. **Science**, Washington, v. 303, n. 5662, p. 1364-1367, Feb., 2004.

ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n. 1/4, não paginado, Jan./Dez. 2001.

BAIMA, S.; POSSENTI, M.; MATTEUCCI, A.; The *Arabidopsis* AtHB-8 HD-Zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. **Plant Physiology**, Rockille, v. 126, n. 2, p. 643-655, Jun. 2001.

BARSALOBRES, C. F. **Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macroarranjos de colônias bacterianas.** 2004. 228p. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BEERS, E. P.; WOFFENDEN, B. J.; ZHAO, C. S. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 399–415, Oct. 2000.

BERNIER, F.; BERNA, A. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? **Plant Physiological Biochemistry, Paris**, v. 39, n. 7/8, p. 545–554, Jul./Aug. 2001.

BOLLER, T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: KOSHUGE, T.; NESTER, E.W. (Ed.) **Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives.** New York: Macmillan, 1987. chap. 7, p. 358-411.



BOLLER, T.; GEHRI, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function. **Planta**, New York, v. 157, n.1, p. 22-31, 1983.

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

BRENNER, S. The human genome - the nature of the enterprise. **Ciba foundation symposia**, Sussex, v. 149, p. 6-17, 1990.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Natural Genetics**. New York, v. 21, p. 33-37 Suppl S., 1999.

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

CARNEIRO, N. P.; HUGHES, P. A.; LARKINS, B. A. The eEFIA gene family is differentially expressed in maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.41, n.6, p.801-813, Dec. 1999.

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

CHEE, M.; YANG, R.; HUBBELL, E.; BERNO, A.; HUANG, X. C.; STERN, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D. J.; MORRIS, M. S.; FODOR, S. P. Accessing genetic information with high-density DNA arrays **Science**, Washington, v. 274, n. 5287, p. 610-614, Oct. 1996.

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

CHIOU, T. J.; LIU, H.; HARRISON, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. **The Plant Journal**, Oxford - UK, v. 25, n. 3, p. 281-293, Feb. 2001.

CLANTIN, B.; HODAK, H.; WILLERY, E.; LOCHT, C.; JACOB-DUBUISSON, F.; VILLERET, V. The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 16, p. 6194-6199, Apr. 2004.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, L. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, Oxford – UK, v.3, n.1, p.31-40, Jan. 1993.

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

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 2, p. 117-127, Apr., 2000.

D'SILVA, I.; POIRIER, G.; HEATH, M. C. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response: a form of programmed cell death. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 245, n. 2, p. 389–399, Dec. 1998.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; RICHBERG, M. H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1793-1807, Oct. 1996.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: **Elsevier Press**, 1987, Chap. 2, p. 7-87.

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

DEMCHENKO, K.; WINZER, T.; STOUGAARD, S.; PARNISKE, M.; PAWLOWSKI K. Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. **New Phytologist**, Oxford - UK, v. 163, n. 6, p. 381-392, Aug. 2004.

DESVAUX, M.; PARHAM, N. J.; HENDERSON, I. R. The autotransporter secretion system. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 53–60, Mar. 2004.

DICRISTINA, M.; SESSA, G.; DOLAN, L. The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. **The Plant Journal**, Oxford - UK, v. 10, n. 3, p. 393-402, Sept. 1996.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**, New York, v. 28, n. 1, p. 165-234, 1990.

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

DURSO, N. A.; CYR, R. J. Beyond translation – Elongation factor-1-alpha and the cytoskeleton. **Protoplasma**, Vienna, v.180, n.3/4, p.99-105, 1994.

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

FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; NOGUEIRA, F. T. S.; ROSA JUNIOR, V. E. de; JORGE, R. A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Genoma funcional: uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biociência**, Brasília, v. 24, p. 60-67, 2002.

FIGUEIRA, A.; KIDO, E. A.; ALMEIDA, R. S. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n.1-4, p.207-220, Jan./Dec. 2001.

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

GENRE, A.; BONFANTE, P. Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organisation in the presence of a mycorrhizal fungus. **Protoplasma**, Vienna, v. 219, n. ½, p. 43-50, 2002.

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

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 122-127, Apr., 2002.

GRIVET, L.; DHONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J. C. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics**, Baltimore, v. 142, n. 3, p. 987-1000, Mar. 1996.

HARRISON, M. J. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, London v. 1, n. 4, p. 360-365, Aug. 1998.

HAUSE, B.; FESTER, T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis **PLANTA**, New York, v. 221, n. 2, p. 184-196, May, 2005.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 8, n. 4, p. 692-744, Dec. 2004.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFLAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7276-7280, Aug. 1991.

KARANDASHOV, V.; NAGY, R.; WEGMÜLLER, S.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 16, p. 6285-6290, Apr., 2004.

KARDAILSKY, I. V.; BREWIN, N. J. Expression of cysteine protease genes in pea nodule development and senescence. **Molecular Plant-Microbe Interact**, St Paul, v. 9, n. 8, p. 689-695, Nov. 1996.

KHORCHID, A.; IKURA, M. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Rockville, v. 38, p. 307-312, 2006.

- KIELISZEWSKI, M. J.; LAMPORT, D. T. A. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. **Plant Journal**, Athens, v. 5, n. 2, p. 157–172, Feb. 1994.
- KISTNER, C.; WINZER, T.; PITZSCHKE, A.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SAMDAL, N.; STOUGAARD, J.; WEBB, K. J.; SZCZYGLOWSKI, K.; PARNISKE, M. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. **The Plant Cell**, Rockville, v.17, n.8, p.2217-2229, Aug., 2005.
- KOIZUMI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; TSUJI, H.; SHINOZAKI, K. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, Amsterdam, v. 129, p. 175–182, 1993.
- KOSUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D. G.; BECARD, G. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 952-962, Mar. 2003.
- KOTA, P.; GUO, D.; ZUBIETA, C.; NOEL, J.; DIXON, R. A. *O*-Methylation of benzaldehyde derivatives by “lignin specific” caffeic acid 3-*O*-methyltransferase. **Phytochemistry**, Oxford – UK, v. 65, n. 7, p. 837–846, Apr. 2004.
- LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorriza arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras/DCS e DCF, 1996. p.5-38.
- LAMBAIS, M. R.; MEHDY, M. C. Suppression of endochitinase,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.6, n.1, p. 75-83, Jan./Feb. 1993.
- LAMBAIS, M. R.; MEHDY, M. C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and beta-1,3-glucanase expression. **New Phytologist**, New York, v. 134, v. 3, p. 531-538, Nov. 1996.
- LAMBAIS, M. R.; RIOS-RUIZ, W. F.; ANDRADE, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford – UK, v. 160, n. 2, p. 421-428, 2003.

LASHKARI, D. A.; DERISI, J. L.; MCCUSKER, J. H.; NAMATH, A. F.; GENTILE, C.; HWANG, S. Y.; BROWN, P. O.; DAVIS, R. W. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 24, p. 13057-13062, Nov. 1997.

LEE, Y. H.; CHUN, J. Y. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 377-384, May. 1998.

LENNON, G. G.; LEHRACH, H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. **Trends in Genetics**, London, v. 7, p. 314-317, 1991.

LÉVY, J.; BRES, C.; GEURTS, R.; CHALHOUB, B.; KULIKOVA, O.; DUC, G.; JOURNET, E.; ANÉ, J.; LAUBER, E.; BISSELING, T.; DÉNARIÉ, J.; ROSENBERG, C.; DEBELLÉ, F. A putative  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. **Science**. Washington, v. 303, n. 5662, p. 1361-1364, Feb. 2004.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**. Washington DC, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIN, Y.; YANG, Z. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-rop1ps antibodies suggests a crucial role for rho-type gtpases in the control of tip growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 9, p. 1647-1659, 1997.

LIN, F.; YAMANO, G.; HASEGAWA, M.; ANZAI, H.; KAWASAKI, S.; KODAMA, O. Cloning and functional analysis of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase from rice (*Oryza sativa*), **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2006.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemistry Reviews**, Washigton, v. 98, n.2, p. 637-674, Mar./Apr.1998.

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

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

MAYDA, E.; TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. A tomato homeobox gene (HD-Zip) is involved in limiting the spread of programmed cell death. **Plant Journal**, Oxford – UK, v. 20, n. 5, p. 591-600, Dec.1999.

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

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. van Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MOFFATT, B. A.; WERETILNYKB, E. A. Sustaining *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in The Plant Cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 435-442, 2001.

MOONS, A.; GIELEN, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; STRAETEN, D. van der; GHEYSEN, G.; MONTAGU, M. van An abscisic-acid- and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family. **Planta**, New York, v. 202, n. 4, p. 443-454, Aug. 1997.

NGUYEN, C.; ROCHA, D.; GRANJEAUD, S.; BALDIT, M.; BERNARD, K.; NAQUET, P.; JORDAN, B. R. Differential gene expression in the *Murine thymus* assayed by quantitative hybridization on arrayed cDNA clones. **Genomics**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 207-216, Sept., 1995.

OLIVEIRA, J. B.; PRADO, H. Carta pedológica semi-detalhada do Estado de São Paulo: quadricula de Piracicaba. 1:100.000. **Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, 1989.

PARK, H. J.; MIURA, Y.; KAWAKITA, K.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N. Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. **Plant and cell physiology**, Oxford – UK, v. 39, n. 11, p. 1218-1225, 1998.

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

PERRET, E.; FERRÁN, E. A.; MARINX, O.; LIAUZUN, P.; DUMONT, X.; FOURNIER, J.; KAGHAD, M.; FERRARA, P.; CAPUT, D. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variation in organized cDNA libraries. **Gene**, Amsterdam, v. 208, p. 103-115, 1998.

PIROZYNSKI, K. A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 59, n. 10, p. 1824-1827, 1981.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, v. 289, n.5486, p.1920-1921, Sept. 2000.

RICHARDS, K. D.; SNOWDEN, K. C.; CARDNER, R. C. *wali6* and *wali7*: genes induced by aluminum in wheat (*trifolium aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n.4, p. 1455-1456, Aug. 1994.

SABATINI, S.; HEIDSTRA, R.; WILDWATER, M.; SCHERES, B. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. **Genes Development**, Plainville, v. 17, n. 3, p. 354-358, Feb. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual III. s.l. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. paginação irregular.

SARRUGE, J. R. Soluções Nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 1, n. 3, p. 231-233, 1975.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 467-471, Oct., 1995.

SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **NATURE**, London, v. 324, n. 6095 p. 365-367, Nov. 1986.



SILVA, J. A. G. da; SORRELLS, M. E.; BURNQUIST, W. L.; TANKSLEY, S. D. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 4, p. 782-791, Aug. 1993.

SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Origin and Diversification of Endomycorrhizal Fungi and Coincidence with Vascular Land Plants. **Nature**, London, v.363, n.6424, p. 67-69, May, 1993.

SINGH, K.; DENNIS, E. S.; ELLIS, J. G.; LLEWELLYN, D. J.; TOKUHISA, J. G.; WAHLEITHNER, J. A. PEACOCK, A. J. OCSBF-1, a maize ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 891-903, Sept. 1990.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, p. 12-21, mar./abr., 2002.

SÖDERMAN, E.; MATTSSON, J.; ENGSTROEM, P. The *Arabidopsis* homeobox gene *AtHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. **Plant Journal**, Oxford, UK, v. 10, n. 2, p. 375-381, Aug. 1996.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, p. 431–443, Mar. 1999.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A. Chitinase in mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, New York, v.177, n. 3, p. 447-455, Apr. 1989.

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

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

VELCULESCU, V. E.; VOGELSEIN, B.; KINZLER, K. W.; ZHANG, L. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 484-488, Oct., 1995.

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

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

VINSON, C. R.; SIGLER, P. B.; MCKNIGHT, S. L. Scissors grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. **Science, Washington**, v. 246, n. 4932, p. 911-916, Nov. 1989.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 276, n. 1, p. 59-64, Dec. 1999.

VOLPIN, H.; ELKIND, Y.; OKON, Y.; KAPULNIK, Y. A vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. **Plant Physiology**, Rockville v. 104, n. 2, p. 683-689, Feb. 1994.

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

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

WEGEL, E.; SCHAUSER, L.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; PARNISKE, M. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 9, p. 933-936, Sept. 1998.

WOLFINGER, R. D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E. D.; BENNETT, L.; HAMADEH, H.; BUSHEL, P.; AFSHARI, C.; PAULES, R. S. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **Journal Of Computational Biology**, Larchmont, v. 8, n. 6, p. 625-637, 2001.

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

YANG, Q.; TRINH, H.X.; IMAI, S. Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 1, p. 81-89, 2004.

YU, S. W.; ZHANG, L. D.; ZUO, K. J.; TANG, D. Q.; SUN, X. F.; TANG, K. X. *Brassica napus* L. homeodomain leucine-zipper gene *bnhb6* responds to abiotic and biotic stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford – UK, v. 47, n. 10, p. 1236-1248, Oct. 2005.

ZHONG, R.; YE, Z. H. *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 2193-2152, Nov. 1999.

ZHOU, D. G.; CHEN, L. M.; HERNANDEZ, L. SHEARS, S. B.; GALAN, J. E. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Molecular Microbiology**, Oxford – UK, v. 39, n. 2, p. 248-259, Jan. 2001.

ZUBIETA, C.; KOTA, P.; FERRER, J. L.; DIXON, R. A.; NOEL, J. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 6, p. 1265–1277, Jun. 2002.