



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto Bioquímica Médica
Laboratório de Biologia Molecular de
Plantas

Pedro Henrique Borges de Figueiredo

FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA DE RESPOSTA AO
ETILENO NA INTERAÇÃO ENTRE CANA-DE-AÇÚCAR
(*SACCHARUM* spp.) E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Pedro Henrique Borges de Figueiredo

**FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA DE RESPOSTA AO ETILENO NA
INTERAÇÃO ENTRE CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* spp.) E
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientadora: Dr^a. Adriana Silva Hemerly

FICHA CATALOGRÁFICA

Figueiredo, Pedro Henrique Borges

Fatores de transcrição da via de resposta ao etileno na interação entre cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e bactérias diazotróficas endofíticas/ Pedro Henrique Borges de Figueiredo. Rio de Janeiro. 2010.

xii, 101f. Il. 31 cm

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica/Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2010.

Orientadora: Adriana Silva Hemerly.

Referências Bibliográficas: f. 77-101

1. Cana-de-açúcar. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Endofíticos. 4. Etileno. 5. Fatores de transcrição ERF. 6. Defesa. 7. ISR. 8. Seca I. Hemerly, Adriana Silva. II.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica,
Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

Pedro Henrique Borges de Figueiredo

Fatores de transcrição da via de resposta ao etileno na interação entre cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e bactérias diazotróficas endofíticas.

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza,
Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Prof^a. Dr^a. Maite Vaslin de Freitas Silva
Inst. de Microbiologia, CCS, UFRJ

Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine
Inst. Bioquímica Médica, CCS, UFRJ

Prof. Dr. Marcio da Silva Almeida (Revisor e Suplente interno)
Inst. Bioquímica Médica, CCS, UFRJ

Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia Muniz de Pádua (Suplente externa)
UEZO

Prof^a. Dr^a. Adriana Silva Hemerly (Orientadora)
Inst. Bioquímica Médica CCS - UFRJ

Rio de Janeiro
Abril/2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Carlos e Angela pelo constante incentivo e motivação.

Ao meu irmão Gustavo pela grande disponibilidade e interesse para qualquer assunto.

À Monique pelo infindável apoio, amor e compreensão.

À Rosália, minha madrinha emprestada, pela imensa hospitalidade e senso de humor.

Ao Dudu pela generosidade e sempre prática visão da vida.

Aos Professores que prontamente aceitaram participar da banca e revisão desta dissertação.

À Prof^a. Adriana Hemerly, pela orientação, grandes conselhos e convivência.

Aos amigos Marcelo e Thiago pelos valiosos ensinamentos, científicos ou não.

À todos os amigos, alunos, pesquisadores e técnicos do LBMP pelas dicas, brincadeiras e auxílio no trabalho.

À todos os amigos que também foram fundamentais nesse caminho.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

RESUMO

FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA VIA DE RESPOSTA AO ETILENO NA INTERAÇÃO ENTRE CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* spp.) E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.

Pedro Henrique Borges de Figueiredo

Orientadora: Adriana Silva Hermerly

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Bactérias que colonizam os tecidos de cana-de-açúcar são de grande interesse por promover o crescimento vegetal, através de fixação biológica de nitrogênio, produção de hormônios vegetais e proteção contra doenças. Diversas evidências apontam que muitos dos benefícios descritos para a associação decorrem de respostas dependentes do genótipo da planta à presença das bactérias em seus tecidos. Estas respostas também parecem ser importantes para o estabelecimento de uma interação benéfica, não-patogênica. Algumas vias regulatórias já foram descritas como responsivas à associação, dentre elas a via de resposta ao etileno. Este trabalho visa estudar a regulação de alguns fatores de transcrição, selecionados em determinados modelos experimentais por serem potencialmente envolvidos na associação, com o objetivo de elucidar a regulação dessa via de sinalização e sua interação com outros estímulos bióticos e abióticos que também estão ligados à sinalização por etileno e podem influenciar ou serem influenciados pela associação. Desta forma estes genes podem ser selecionados para estudos de expressão gênica ou como marcadores moleculares de interação eficiente. Os genes (ScERF1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8) foram caracterizados filogeneticamente, revelando-se que seis deles pertencem ao subgrupo VII (ScERF1, 2, 3, 4, 6 e 7) e ScERF8 pertence ao subgrupo VIII da família ERF. A expressão destes genes foi analisada pela técnica de PCR em tempo real sob estímulos bióticos e abióticos já descritos para a sinalização do etileno e possivelmente envolvidos também na interação. O tecido preferencial de regulação dos níveis de expressão dos ERFs foi o sistema radicular, especialmente do genótipo de associação eficiente. Os dados observados indicam que alguns ERFs respondem diferencialmente em função da espécie de endofítico inoculada enquanto outros a patógenos. Apesar de alguns ERFs responderem à inoculação com endofíticos, esta parece sensibilizar a planta, tornando-a mais responsiva a outros estímulos, como a inoculação de um patógeno ou o aumento da resistência à seca.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; bactérias diazotróficas; endofíticos; etileno; fatores de transcrição ERF; defesa; ISR; seca.

Rio de Janeiro

Abril/2010

ABSTRACT

TRANSCRIPTION FACTORS OF THE ETHYLENE RESPONSE PATHWAY INVOLVED IN THE INTERACTION BETWEEN SUGARCANE (*SACCHARUM* spp.) AND DIAZOTROFIC ENDOPHYTIC BACTERIA.

Pedro Henrique Borges de Figueiredo

Adviser: Adriana Silva Hermerly

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Bacteria that colonize sugarcane tissues are of great interest since they can promote plant growth through nitrogen fixation, plant hormone production and induced resistance against diseases. Data suggests that many of the benefits seen in this association come from the plant responses to the presence of the bacteria in its tissues controlled by its genotype. These responses also seem to be relevant to the establishment of a positive, non-pathogenic interaction. Several regulatory pathways have already been shown to be responsive to the association, such as the one regulated by the hormone ethylene. This work aims to understand the regulation of the ethylene signaling pathway and its interaction with other biotic and abiotic stimuli related to this pathway, through the study of the differential expression of some of the transcription factors selected, in different experimental models, for their potential involvement in the interaction. These genes can then be selected for functional studies or as molecular markers of an efficient association. The genes (ScERF1, 2, 3, 4, 6, 7 and 8) were characterized for their phylogeny. Six of them revealed to be in the subgroup VII (ScERF1, 2, 3, 4, 6 and 7) and one, ScERF8, to the subgroup VIII of the ERF family. Their expression were analyzed with real time qPCR under biotic and abiotic stimuli already shown to generate responses in the ethylene pathway and possibly involved in the interaction. The roots seem to be the preferential tissue for the ERFs expression, especially of the genotype with better association efficiency. Data suggests that some of the ERFs are regulated differently by the inoculation with different endophytic bacteria, while others when inoculated with pathogenic bacteria. Even though some ERFs respond to the inoculation with diazotrophic bacteria, it seems that the inoculation with these microorganisms makes the plant more responsive to other stimuli, such as more resistant to pathogen inoculation or more tolerant to drought stress.

Key-words: sugarcane; endophytic diazotrophic bacteria; ethylene; ERF transcription factors; defense; ISR; drought.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA GERAL DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE RESPOSTA PARA O ETILENO.....	13
FIGURA 2 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF1.	31
FIGURA 3 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF2..	32
FIGURA 4 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF3..	33
FIGURA 5 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF4..	34
FIGURA 6 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF6.	35
FIGURA 7 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE ScERF7.	36
FIGURA 8 – ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS ScERF8..	37
FIGURA 9 – ÁRVORE FILOGENÉTICA COM OS ERFs DE ARABIDOPSIS.	39
FIGURA 10 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ERFs DA SUBFAMÍLIA VII.....	41
FIGURA 11 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS ERFs EM PLÂNTULAS TRATADAS COM ETILENO E JASMONATO.	43
FIGURA 12 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM ENDOFÍTICOS.	46
FIGURA 13 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs APÓS INOCULAÇÃO COM PATÓGENO..	48
FIGURA 14 – QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA POPULAÇÃO DAS CEPAS DE <i>H. RUBRISUBALBICANS</i> COLONIZANDO PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.	50
FIGURA 15 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO COM <i>H. RUBRISUBALBICANS</i> E SEUS MUTANTES.	52
FIGURA 16 – RESULTADO DO ENRAIZAMENTO EM MEIO HIDROPÔNICO.....	55
FIGURA 17 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs NA INDUÇÃO DA DEFESA CONTRA Xa PROMOVIDA POR Gd.. ..	57
FIGURA 18 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs EM RESPOSTA A ESTRESSE OSMÓTICO.	59
FIGURA 19 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ERFs EM FASES DO DESENVOLVIMENTO DO GENÓTIPO EFICIENTE	61
FIGURA 20 – MODELO DA PROMOÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA E TOLERÂNCIA SISTÊMICA INDUZIDA POR ENDOFÍTICOS DIAZOTRÓFICOS EM CANA-DE-AÇÚCAR MEDIADA POR ERFs.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C – grau Celsius
- µL, µg – microlitro, micrograma
- ABA – Ácido Abscísico
- AS – Ácido Salicílico
- AIA – Ácido Indol Acético
- AP2 – Domínio de ligação ao DNA inicialmente descrito na proteína APETALA2
- Avr – fatores relacionados à virulência
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BPCV – Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
- cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar
- CTR – *Constitutive Triple Response*
- DEPC – dietilpirocarbonato
- DO – Densidade Óptica
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNase I – desoxirribonuclease I
- dNTP – deoxinucleotídeo trifosfato
- EAR - *ERF-associated amphiphilic repression*
- EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EIN – *Ethylene Insensitive*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EREBP – *Ethylene Responsive Element Binding Protein*
- ERF – *Ethylene Response Factor*
- ERS – *Ethylene Response Sensor*
- EST – *Expressed Sequence Tags*
- ETR – *Ethylene Receptor*
- FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio
- FPCV – Fungos Promotores de Crescimento Vegetal
- g – grama (unidade de peso) / gravidade (aceleração centrífuga)
- Gd – *Gluconacetobacter diazotrophicus*
- Hr – *Herbaspirillum rubrisubalbicans*
- Xa – *Xanthomonas albilineans*
- RSI – Resistência Sistêmica Induzida (*Induced Systemic Resistance*)
- KCl – Cloreto de Potássio
- LiCl – Cloreto de Lítio
- µM – Micromolar
- mM – millimolar
- M – molar

- MeJa – metil-jasmonato
- mg – miligrama
- $MgCl_2$ – cloreto de magnésio
- N – nitrogênio
- N_2 – dinitrogênio
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NaOAc – Acetato de Sódio
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- ng – nanograma
- O_2 – Oxigênio
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)
- pH – potencial hidrogeniônico
- PR – proteínas relacionadas à resistência
- R – fatores relacionados à resistência
- RH – resposta hipersensitiva
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RNAm – Ácido Ribonucléico Mensageiro
- RNAr – Ácido Ribonucléico Ribossomal
- RNase – Ribonuclease
- RPCV – Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
- rpm – Rotações por Minuto
- RSA – Resistência Sistêmica Adquirida (*Systemic Acquired Resistance*)
- SDS – *Sodium Dodecil Sulfate* (Sodecil Sulfato de Sódio)
- SUCEST – *Sugarcane Expression Sequence Tags*
- TAE – tampão tris (tri- hidroximetil aminometano) acetato EDTA pH 8,0
- Taq – DNA polimerase de *Thermus aquaticus*
- u – unidade de enzima
- UV – ultravioleta
- V – volts

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Interação cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas.....	1
1.1.1 – A cana-de-açúcar	1
1.1.2 – Bactérias diazotróficas endofíticas.....	2
1.1.3 – <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	4
1.1.4 – <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	5
1.1.5 – Modelos de estudo da associação.....	6
1.2 – Sinalização hormonal de estímulos bióticos em plantas	8
1.2.1 – O etileno na sinalização de estímulos bióticos.....	8
1.2.2 – Etileno na Resistência Sistêmica Induzida.....	10
1.2.3 – Etileno na integração de estímulos bióticos e abióticos	11
1.2.4 – A via de resposta ao etileno	12
1.3 – A sinalização do etileno e a interação de cana-de-açúcar – bactérias diazotróficas endofíticas	15
1.4 Estudos prévios	17
2 – OBJETIVOS	18
2.1 – Objetivo Geral	18
2.2 – Objetivos específicos.....	18
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 – Análise das seqüências dos ERFs.....	20
3.2 – Preparação do material vegetal	20
3.2.1 – Micropropagação e enraizamento de plantas de cana-de-açúcar crescidas <i>in vitro</i>	20
3.3 – Tratamentos das plantas com microrganismos	21
3.3.1 – Inoculação das plantas de cana-de-açúcar propagadas <i>in vitro</i>	21
3.3.2 – Inoculação com patógenos.....	22
3.3.3 – Inoculação de plantas multiplicadas <i>in vitro</i> em meio hidropônico	22
3.3.4 – Detecção de bactérias colonizando tecidos da planta	23
3.4 – Tratamentos das plantas <i>in vitro</i> com etephon e jasmonato	24
3.5 – Tratamentos de estresse osmótico	24
3.6 – Extração de RNA	25
3.7 – Síntese de 1ª fita de cDNA	26
3.8 – RT-PCR em tempo real	27
3.9 Análise estatística.....	29

4 – RESULTADOS.....	30
4.1 – Classificação filogenética dos fatores de transcrição responsivos a etileno (ERFs) na interação cana-de-açúcar – bactérias diazotróficas.....	30
4.2 – Verificação da resposta dos ERFs ao etileno, jasmonato e sua combinação	42
4.3 – Caracterização da expressão dos ERFs em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas benéficas.....	44
4.4 – Comparação da regulação dos ERFs em plantas inoculadas com as bactérias benéficas e patogênicas	47
4.5 – Regulação da expressão por inoculação com mutantes não patogênicos de <i>H. rubrisubalbicans</i>	49
4.6 – Estudo da regulação da expressão gênica dos ERFs durante a promoção da defesa por <i>G. diazotrophicus</i> contra <i>X. albilineans</i>	53
4.6.1 – Desenvolvimento de um novo sistema de inoculação com as bactérias endofíticas	53
4.6.2 – Estudo da regulação da expressão gênica dos ERFs.....	56
4.7 – Avaliação da resposta da expressão gênica dos ERFs ao estresse osmótico	58
4.8 – Caracterização do padrão de expressão de ERFs de cana-de-açúcar durante o desenvolvimento.....	60
4.9 – Expressão diferencial entre genótipos contrastantes.....	62
5 – DISCUSSÃO	65
5.1 – Filogenia e possíveis funções dos ERFs de cana-de-açúcar.....	65
5.2 – Regulação gênica dos ERFs em resposta a inoculação com endofíticos	67
5.3 – A interação cana-de-açúcar – bactérias endofíticas e resistência a estresse biótico e abiótico mediada por ERFs.....	69
5.4 – ERFs como marcadores de associação eficiente	73
6 – CONCLUSÕES	76
7 – BIBLIOGRAFIA	77

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Interação cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas

1.1.1 – A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea perene de clima tropical que tem como principal característica de interesse comercial a capacidade de acumular grandes concentrações de sacarose em seus caules. Algumas das espécies que compreendem o gênero são: *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Os cultivares usados na agricultura são híbridos aneuplóides e autopoliplóides das duas últimas, variando entre $2n=100$ e $2n=130$ cromossomos, tornando a cana-de-açúcar uma das espécies cultiváveis de maior complexidade genômica (Nair e cols., 1999; Grivet e cols., 2001). Os híbridos cultivados acumulam quantidades muito superiores de sacarose em seus colmos, mais largos e menos fibrosos, enquanto espécies selvagens como *S. spontaneum* apresentam ampla resistência a patógenos e ao frio apesar da baixa produtividade. Outras características da cana-de-açúcar dificultam substancialmente as pesquisas com essa planta. Fisiologicamente, a cana difere da maioria das plantas cultivadas por guardar a maior parte de suas reservas energéticas em órgãos vegetativos (Grivet e cols., 2001). Estas características tornam difíceis tanto as abordagens de modelamento agronômicas quanto o melhoramento genético, uma vez que ferramentas como a seqüência do genoma e crescente número de mutantes caracterizados ainda não estão disponíveis em cana-de-açúcar (Inman-Bamber e cols., 2005).

No Brasil o cultivo de cana-de-açúcar é feito visando basicamente dois subprodutos: açúcar e o etanol. O Brasil produziu em 2007 549.707.328 toneladas de cana-de-açúcar, equivalente a 34,6% da produção mundial (FAO, 2009).

Devido a crescentes preocupações com os efeitos no aquecimento global decorrentes da queima de combustíveis fósseis, muitos incentivos estão surgindo para a utilização de fontes renováveis de combustíveis. No ano de 2009 o consumo de etanol ultrapassou o de gasolina no Brasil (ANP, 2009). Estima-se, portanto que haverá uma crescente demanda por esse produto, elevando as pressões por expansão da produção.

O plantio de cana deverá ser melhorado não só para aumentar a produtividade, mas para reduzir o impacto ambiental, tornando o produto mais atrativo no mercado externo sem comprometer o rico ativo ambiental brasileiro. Isto pode ser realizado com a aplicação de diversas técnicas que diminuam as queimadas pós-colheitas e a utilização de água, direcionem a expansão do cultivo para regiões que não comprometam a biodiversidade, diminuam a aplicação de fertilizantes, pesticidas e outros insumos provenientes de fontes fósseis, e aumentem da produtividade por hectare entre outros fatores.

1.1.2 – Bactérias diazotróficas endofíticas

Os benefícios de associações entre plantas e microorganismos fixadores de nitrogênio já são conhecidos, como *rhizobium* em leguminosas, onde existe a formação de estruturas nas raízes que contém bactérias capazes de fixar nitrogênio (D’Haeze e cols., 2002). Estudos posteriores, no entanto revelaram que existem outras formas de associações entre plantas e bactérias diazotróficas, promotoras de crescimento vegetal, na qual não existe a formação de nódulos da raiz. Nessa associação a bactéria coloniza o espaço intercelular de diversos tecidos de gramíneas, e especialmente tecidos vasculares (Pedraza, 2008). Diversas espécies de bactérias endofíticas foram isoladas de gramíneas de grande interesse agrônomo, como milho, arroz e cana-de-açúcar. Estas bactérias formam uma associação benéfica com a planta sendo capazes de fixar nitrogênio, sintetizar hormônios

vegetais, induzir o desenvolvimento radicular, especialmente na formação de raízes laterais e induzir resistência a doenças (Olivares e cols., 2002; Oliveira e cols., 2002; Arencibia e cols., 2006; Pedraza, 2008; Bertalan e cols., 2009). Dentre as bactérias encontradas estão: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, e *Burkholderia tropicalis* (Baldani e cols., 1986; Cavalcante e cols., 1988; Baldani e cols., 1992; Baldani e cols., 1996; Baldani e cols., 2000; Pimentel e cols., 2001).

Diversas evidências indicam que o genótipo da planta é importante para determinar a eficiência da associação com as bactérias diazotróficas endofíticas (Vargas e cols., 2003). Um exemplo do papel do genótipo da planta no estabelecimento da associação ocorre no reconhecimento do microorganismo por parte da planta. O genótipo de cana-de-açúcar B-4362, por exemplo, desenvolve uma doença conhecida como estria mosqueada quando inoculada com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Olivares, 1997) enquanto esse mesmo endofítico não é patogênico nas outras variedades de cana. Aliado a isso, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) se mostrou muito variável em função do genótipo de cana-de-açúcar onde a associação com bactérias diazotróficas ocorre (Urquiaga e cols., 1992). Diferentes genótipos de cana-de-açúcar podem apresentar taxas muito distintas de FBN: a espécie *Saccharum spontaneum* L. (Krakatau) pode ter até 79% de nitrogênio proveniente de FBN, assim como o genótipo SP70-1143 (*Saccharum spp.*, híbrido) que pode ter até 72%, enquanto *Saccharum barberi* Jesw. (Chunee) apresenta taxas em torno de 34%, sugerindo que existe um controle pela planta muito importante para a eficiência da interação (Urquiaga e cols., 1992).

A presença destas bactérias nos tecidos da planta pode gerar benefícios tão variados como: solubilização de nutrientes do solo, fixação de nitrogênio (Urquiaga e cols., 1992),

produção de hormônios vegetais (James e cols., 2001), aumento da resistência a doenças (Arencibia e cols., 2006) e à seca (Arzanesh e cols., 2009). A utilização de inoculantes destas bactérias em cultivo pode gerar grandes benefícios ao agricultor: menores gastos com aplicação de adubo nitrogenado e pesticidas além de redução de perdas por seca ou doenças são exemplos. Isto, no entanto depende da disponibilidade de cultivares aptos a tirar maior proveito dos benefícios gerados pela presença das bactérias diazotróficas endofíticas.

1.1.3 – *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Esta alphaproteobactéria microaeróbia, inicialmente isolada de tecidos de cana-de-açúcar superficialmente esterilizados, foi primeiramente classificada como *Acetobacter diazotrophicus*. (Gillis e cols., 1989). A fonte de carbono preferencialmente usada nos meio para isolamento desta bactéria é a sacarose (Döbereiner e cols., 1988), mas dados experimentais já mostraram que a bactéria converte sacarose em beta 1,2-oligofrutos e posteriormente em frutose (Hernandez e cols., 1995).

Apesar de muitos organismos serem capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN), foi demonstrado que *G. diazotrophicus*, presente em números iguais ou superiores a 10^6 células g^{-1} de peso fresco (Reis e cols., 1994), fixa N_2 dentro dos tecidos da cana-de-açúcar, especialmente xilema das raízes, sem causar sintomas de doença (Cavalcante e cols., 1988; James e cols., 1994). Tolerância a ácido, inabilidade de usar nitrato como única fonte de nitrogênio e a capacidade de fixar nitrogênio na presença de amônia em meio com alta concentração de açúcares são algumas de suas características marcantes. *G. diazotrophicus* é suficientemente tolerante a O_2 para ser capaz de continuar fixando N_2 em uma pO_2 de 4% em 10% de sacarose (Boddey e cols., 1991; Boddey e cols., 1995).

Apesar de ter sido isolada da rizosfera de cana-de-açúcar (Muthukumarasamy e cols., 2005), sua baixa taxa de sobrevivência (Caruso e cols., 1995) em solo e total ausência em amostras de solo coletadas entre fileiras de plantas sugerem um estilo de vida endofítico. (Boddey e cols., 1991; Dong e cols., 1994; Baldani e cols., 1997). Além da FBN, outras características contribuem para sua importância biotecnológica. Um mutante *nif*-, contribui com o crescimento vegetal, especialmente nas raízes, indicando que *G. diazotrophicus* secreta substâncias promotoras de crescimento, como o hormônio vegetal auxina (Sevilla e cols., 2001). Foi demonstrada a produção de uma bacteriozima semelhante à lisozima que inibe o crescimento do patógeno *Xanthomonas albilineans* (Blanco e cols., 2005). Sabe-se também que *G. diazotrophicus* possui atividade antifúngica contra *Fusarium sp.* e *Helminthosporium carbonum* (Mehnaz e cols., 2006) e promove o aumento da solubilidade de fosfato e zinco (Saravanan e cols., 2007; Bertalan e cols., 2009).

No que diz respeito ao hospedeiro, *G. diazotrophicus* possui relativa especificidade, colonizando principalmente plantas com alto teor de amido/açúcar como, cana-de-açúcar, *Pennisetum purpureum*, batata doce (*Ipomoea batatas*) (Paula e cols., 1991) além do café (*Coffea arabica*) (Jiménez-Salgado e cols., 1997).

O genoma de *G. diazotrophicus* foi seqüenciado, e genes relacionados ao modo de vida endofítico, fixação de nitrogênio, promoção do crescimento vegetal, metabolismo de açúcares, sistemas de transporte, síntese de auxina e produção de bacteriocinas foram encontrados (Bertalan e cols., 2009).

1.1.4 – *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Agente causadora da estria mosqueada, esta betaproteobacteria, inicialmente classificada como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Hale e cols., 1972) e posteriormente

reclassificada como *H. rubrisubalbicans*, foi a única endofítica patogênica diazotrófica descrita (Baldani e cols., 1996). Ambas as espécies do gênero *Herbaspirillum* podem causar alguns sintomas em certas variedades de sorgo. Os sintomas causados por *H. rubrisubalbicans*, no entanto são mais intensos (James e cols., 1997). *H. rubrisubalbicans* também causa a doença no cultivar susceptível de cana-se-açúcar B-4362, originário de Barbados. Não foi detectada doença na inoculação de cultivares comerciais (Olivares e cols., 1997). A doença da estria mosqueada é de pequena importância econômica, afetando poucos cultivares. A planta doente não morre, apenas têm sua área fotossintética reduzida (Olivares e cols., 1997).

Recentemente foi demonstrado que esta bactéria necessita do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) funcional para causar doença sendo os mutantes para os genes *hrpE* e *hrcN* incapazes de causar patogenicidade em folhas de Vigna e no cultivar susceptível B-4362 (Schmidt, 2009). O genoma parcial desta bactéria está disponível pelo GENOPAR (www.genopar.org).

Assim como *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans* não pode ser isolado do solo, sugerindo um modo de vida endofítico (Baldani e cols., 1996).

1.1.5 – Modelos de estudo da associação

Uma vez que a propagação da cana-de-açúcar é feita vegetativamente e as bactérias endofíticas são levadas para a próxima geração, uma forma de estudar os mecanismos de sinalização da planta envolvidos na associação é germinar toletes, com gemas individualizadas em potes contendo areia e vermiculita, dando origem a novas plântulas. Os tecidos aéreos são desenvolvidos rapidamente a partir da gema, enquanto raízes se desenvolvem a partir do tolete. As raízes formadas da gema surgem apenas após dois meses

da germinação, geralmente depois que a planta precisa ser transferida para o solo. Durante a germinação, ocorre um rápido aumento da população de bactérias presente nos tecidos da planta, semelhante a uma inoculação, procedido por um gradual declínio ao longo de desenvolvimento (Muñoz-Rojas e cols., 2003). Um problema com esta abordagem é a falta de controle em relação aos microorganismos presentes nos tecidos e a impossibilidade de recuperar raízes formadas a partir da nova planta.

Para estudar a resposta da planta livre de microorganismos à inoculação com cepas específicas, foi desenvolvida a técnica de inoculação de culturas *in vitro* de meristemas estéreis micropropagados (James e cols., 1994). Como a entrada das bactérias ocorre predominantemente pelas raízes, a formação destas precisa ser induzida por hormônios em meio de cultura. Este método, no entanto envolve condições muito distantes das encontradas pela planta em solo, uma vez que a planta não depende exclusivamente da fotossíntese como fonte de carbono nem do transporte eficiente de nutrientes para as folhas. As raízes formadas por este método, portanto não são plenamente funcionais, e apresentam uma massa muito reduzida.

Visto que as raízes também são responsáveis por abrigar o maior número de bactérias diazotróficas endofíticas na planta, torna-se necessário estudar as regulações gênicas específicas destas, o que cria um problema: plântulas enraizadas *in vitro* têm raízes em condições fisiológicas muito distantes das naturais e em massa muito reduzida, enquanto planta no campo são naturalmente infestadas por bactérias endofíticas e a recuperação de RNA de raízes no solo é extremamente ineficiente.

Faz-se necessário, portanto o desenvolvimento de um sistema onde plântulas, livres de endofíticos, possam ser inoculadas e sua resposta estudada separadamente em raízes e parte aérea.

1.2 – Sinalização hormonal de estímulos bióticos em plantas

Diferentemente da maioria dos animais, plantas são organismos que possuem um desenvolvimento contínuo, novos órgãos e tecidos são gerados durante toda a vida do indivíduo. As plantas utilizam desta característica para responder a estímulos diversos. Por serem capazes de produzir novos órgãos, plantas podem “abdicar” de partes doentes para impedir o avanço de uma doença, estimular ou suprimir o desenvolvimento de outros de acordo com disponibilidade de recursos e condições climáticas. Sendo assim, o desenvolvimento vegetal está intimamente ligado às respostas contra patógenos e estresses abióticos. Para tal, é necessária a ação de diversas vias regulatórias capazes de perceber os estímulos, e induzirem a resposta apropriada (Penninckx e cols., 1998; Memelink, 2009).

Os vegetais dispõem de uma gama de moléculas responsáveis por sinalizar os diferentes estímulos bióticos e abióticos e realizar o balanço entre desenvolvimento e proteção; dentre eles estão os hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, citocininas, ácido jasmônico, entre outros. A sinalização destes diferentes estímulos pode ocorrer de maneira integrada e as vias costumam se intercomunicar, unindo estímulos bióticos e abióticos a respostas fisiológicas e de desenvolvimento (Etheridge e cols., 2005; Fujita e cols., 2006; Ruzicka e cols., 2007; Chung e cols., 2008).

1.2.1 – O etileno na sinalização de estímulos bióticos

Contrastante com a simplicidade da molécula de etileno, as redes regulatórias envolvidas na sinalização e resposta a esse hormônio são de grande complexidade,

principalmente por interagir com diversas outras sinalizações hormonais (Stepanova e cols., 2009). A participação do hormônio vegetal etileno já foi observada na germinação, desenvolvimento de pêlos nas raízes, senescência floral, abscisão e amadurecimento da fruta, produção de auxinas e aumento da divisão de células meristemáticas nas raízes (Johnson e cols., 1998; Swarup e cols., 2007; Ortega-Martinez e cols., 2007; Ruzicka e cols., 2007; Bapat e cols., 2010).

Na interação com microorganismos benéficos, já foram descritos dois papéis para a via de resposta ao etileno: o controle do número de cordões de infecção nas raízes por *rhizobium* (Iniguez e cols., 2005; Vernie e cols., 2008) em leguminosas e a indução de defesa sistêmica promovida por RPCV (Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal) ou FPCV (Fungos Promotores de Crescimento Vegetal) (Kloepper e cols., 2004; Van Loon e cols., 2006; Pozo e cols., 2007).

No modelo *rhizobium*, o etileno inibe a quantidade de bactérias nos nódulos, ao mesmo tempo em que aumenta o número destes e induz formação de raízes laterais (Vernie e cols., 2008; Lohar e cols., 2009). Acredita-se que o etileno seja responsável pela ativação de genes de defesa durante este tipo de associação benéfica para limitar o consumo de açúcares da planta por parte de bactérias fixadoras de nitrogênio (Lohar e cols., 2009). Mutantes de *M. truncaluta* insensíveis a etileno são super-infectadas por seus simbiossiontes (Penmetsa e cols., 1997) assim como *Lotus japonicus* (Lohar e cols., 2009).

Uma das consequências da associação de plantas com RPCV ou FPCV é a indução de um tipo de resistência sistêmica mediada por etileno e ácido jasmônico, capaz de proteger a planta contra uma ampla gama de patógenos (Ton e cols., 2002; Van der Ent e cols., 2008; Segarra e cols., 2009). Este tipo de resposta já foi verificado em diversas espécies de plantas.

Algumas RPCV já descritas são espécies não-patogênicas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (Van Loon e cols., 1998; Kloepper e cols., 2004; Van Loon e cols., 2006). Esta sinalização, no entanto não ocorre pelo aumento dos níveis de etileno, mas da sensibilidade da planta ao hormônio (Pieterse e cols., 2000; Van der Ent e cols., 2009).

1.2.2 – Etileno na Resistência Sistêmica Induzida

As plantas possuem duas formas de acionar mecanismos sistêmicos e duradouros de defesa contra patógenos, chamadas de RSA (Resistência Sistêmica Adquirida) e RSI (Resistência Sistêmica Induzida). Estas respostas possuem algumas diferenças claras. RSA é uma resposta sistêmica, mediada por ácido salicílico (AS), a um contato pontual com um patógeno e pode ser ativada pela aplicação de AS na planta. RSI é uma resposta sistêmica, induzida por um microorganismo não patogênico da rizosfera, dependente das vias de etileno e jasmonato funcionais na planta e não é ativada pela aplicação destas moléculas sinalizadoras (Knoester e cols., 1999; Pieterse e cols., 2000).

A funcionalidade da resposta do tipo RSI foi verificada contra fungos, bactérias e vírus em *Arabidopsis thaliana*, feijão, cravo, pepino, rabanete, tabaco e tomate, mesmo com a separação espacial entre bactérias indutoras e patógenos (Knoester e cols., 1999; Heil e cols., 2002). As cepas de bactérias diferem em sua capacidade de induzir esse tipo de resposta em diferentes espécies de plantas assim como diferentes plantas mostraram variação na expressão de RSI dependendo da inoculação com cepas específicas (Van der Ent e cols., 2009). As moléculas indutoras desse tipo de resposta podem ser flagelina, lipopolissacarídeos e sideróforos. Algumas rizobactérias induzem resistência através de vias dependentes de etileno e jasmonato (Vallad e cols., 2004). Não é observável nenhuma alteração consistente na planta sob estado induzido, mas estas respondem de forma mais

rápida e intensa quando inoculadas com patógenos. RSI é funcional em condições de campo e oferece um mecanismo natural de resistência a doenças (Van Loon e cols., 1998; Van Loon e cols., 2006).

A via de RSI também atua no controle da população de duas espécies de endofíticos estudadas em *Medicago truncatula*: *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium*, enquanto a via de resposta a AS foi capaz de reduzir apenas *Salmonella typhimurium* (Iniguez e cols., 2005). Esta via também se mostrou menos eficaz contra bactérias deficientes em componentes dos flagelos e sistema de secreção do tipo III (Iniguez e cols., 2005).

1.2.3 – Etileno na integração de estímulos bióticos e abióticos

Plantas sob estresse hídrico têm elevada síntese de etileno, que age como regulador negativo do crescimento e causa a senescência. O principal antagonista da síntese do etileno é outro hormônio vegetal, o ácido abscísico (ABA) (Anderson e cols., 2004) descrito como o principal sinalizador de estresse hídrico. O ABA induz a expressão de genes relacionados a estresse hídrico e reprime genes relacionados a sinalização por etileno (Huang e cols., 2008), muitas vezes atuando como um regulador negativo da defesa contra patógenos (Mauch-Mani e cols., 2005). Foi descrito que a sinalização por ABA sobrepõe os sinais regulados por etileno (Fujita e cols., 2006). A influência negativa do estresse hídrico sobre a resistência contra patógenos já é bem conhecida, mas pouco é sabido sobre a interação entre gramíneas e bactérias diazotróficas. Plantas inoculadas com estas bactérias podem inclusive se tornarem mais resistentes ao estresse hídrico (Casanovas e cols., 2002), evidenciando a ligação entre estímulos ambientais e a interação benéfica planta-microorganismo. No modelo de rizóbio, no entanto, o hormônio ABA tem atividade semelhante ao etileno e ao jasmonato, regulando a nodulação e limitando a infecção por bactérias (Ding e cols., 2008).

1.2.4 – A via de resposta ao etileno

Os receptores de etileno são codificados por uma família gênica e estão localizados na membrana do retículo endoplasmático (Etheridge e cols., 2005) onde agem como reguladores negativos da via de sinalização ao etileno (Figura 1). Na ausência do hormônio os receptores mantêm a proteína CTR1 (Constitutive Triple Response) em seu estado ativo, inibindo ativamente a cascata de sinalização através da inibição do transportador EIN2 (Ethylene Insensitive). Na presença do etileno, os receptores inativam CRT1 permitindo a atividade de EIN2 que por sua vez inativam as E3 ligase EBF1 (EIN3 binding f-box) e EBF2, permitindo a transcrição dos fatores de transcrição EIN3 e ERF (Ethylene Responsive Factor) (Etheridge e cols., 2005). A regulação da expressão gênica dos ERFs é um ponto de encontro das vias de sinalização do etileno e do jasmonato, que através da proteína COI1 também induz a expressão de proteína da família AP2/ERF.

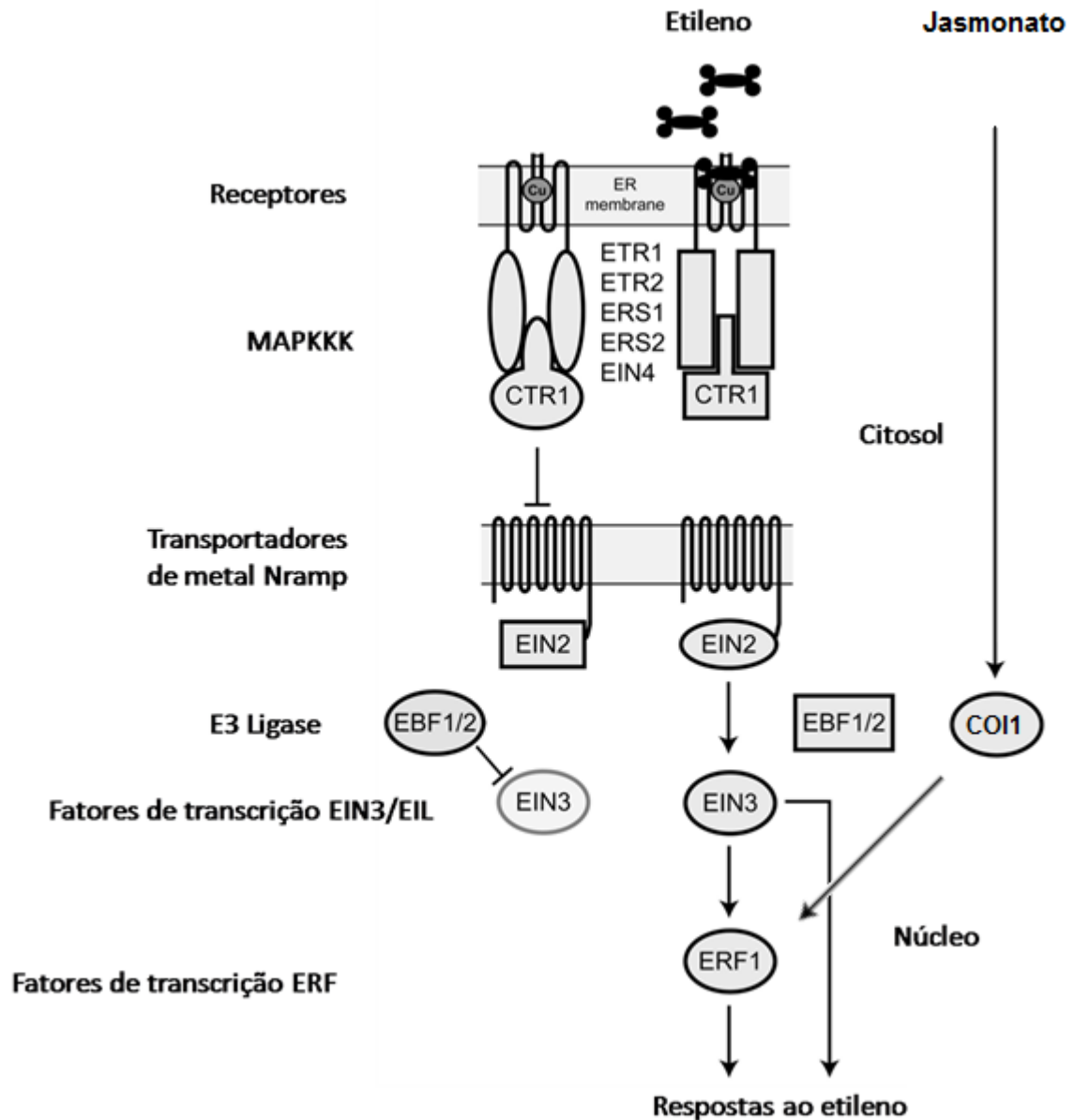


Figura 1 - Esquema geral da via de sinalização de resposta para o etileno. Na ausência de etileno (lado esquerdo da figura) os receptores mantêm CTR1 no estado ativado, isto inibe os componentes da cascata e, portanto a resposta. Simultaneamente, o fator de transcrição EIN3 é constantemente degradado por EBF1 e EBF2 através de ubiquitinação. Com a ligação do etileno (lado direito da figura), o receptor CTR1 é inativado. A repressão da cascata de sinalização é então cancelada, permitindo a ativação dos fatores de transcrição EIN3/EIL e ERF1. O etileno promove também o acúmulo de EIN3 pela repressão de EBF1 e EBF2. (Adaptado de Etheridge e cols, 2005).

Os fatores de transcrição responsivos a etileno, ERFs são membros da superfamília AP2/ERF (Riechmann e cols., 2000) caracterizados por possuírem uma região de 60 a 70 aminoácidos que compreende o domínio de ligação ao DNA AP2 (Nakano e cols., 2006). As proteínas da família AP2, como APETALA2, possuem dois domínios AP2 repetidos, enquanto as proteínas da família ERF apenas um (Nakano e cols., 2006). Já foi demonstrada a participação destas proteínas na regulação transcricional de diversos processos biológicos como desenvolvimento e resposta a estímulos ambientais (Hattori e cols., 2009).

O seqüenciamento do genoma de *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) revelou 145 genes com o domínio AP2, sendo que 121 (83%) são da família ERF (Sakuma e cols., 2002), a maioria ainda com função desconhecida. Uma revisão filogenética mais recente classificou 122 membros da família ERF em Arabidopsis em 12 subgrupos (I, II, III, IV, V, VI, VI-L, VII, VIII, IX, X e Xb-L) e 139 em arroz foram classificados 14 subgrupos (I – XIV), revelando a divergência genética entre os subgrupos e a presença de domínios conservados entre os membros de cada subgrupo (Nakano e cols., 2006).

A busca por fatores de transcrição envolvidos com a resposta de defesa revelou que 12% dos fatores de transcrição co-regulados pela inoculação de *A. thaliana* com *Alternaria brassicicola* ou tratamento com MeJA (metil-jasmonato) são da família AP2/ERF, sugerindo que estas proteínas são um provável elo entre a sinalização de etileno e jasmonato envolvida na resposta a patógenos (McGrath e cols., 2005).

Além de desenvolvimento e defesa, as ERFs também podem estar envolvidas com sinalização de estresse abiótico como seca, frio e estresse osmótico (Cheong e cols., 2003; Zhu e cols., 2003; Yi e cols., 2004; Welsch e cols., 2007; Wu e cols., 2008).

1.3 – A sinalização do etileno e a interação de cana-de-açúcar – bactérias diazotróficas endofíticas

O projeto SUCEST foi uma iniciativa de uma rede de laboratórios no Brasil para o seqüenciamento do transcriptoma da cana-de-açúcar (Vettore e cols., 2003). Um banco de dados com as seqüências de ESTs (Expressed Sequence Tags) foi montado a partir de 37 bibliotecas, dentre elas, plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Vettore e cols., 2001). Buscas neste banco de dados geraram informação sobre diversos genes preferencialmente ou exclusivamente expressos durante a interação com os endófitos. Os genes identificados estão envolvidos em diversos processos como: metabolismo de nitrogênio, desenvolvimento, homólogos de nodulinas e vias de sinalização do tipo LRR-quinase e do etileno. Alguns ainda têm sua função desconhecida, podendo vir a ser genes novos de atividade exclusiva nesta associação (Nogueira e cols., 2001; Vinagre e cols., 2005; Cavalcante e cols., 2007).

Buscas por genes preferencialmente expressos em bibliotecas de plântulas inoculadas com bactérias endofíticas identificaram alguns genes da via do etileno, em especial um receptor, denominado ScER1 e dois fatores de transcrição responsivos a etileno (ERF) chamados de ScERF1 e ScERF2 (Cavalcante e cols., 2007). ESTs identificados no banco de dados do SUCEST foram utilizadas para a montagem de uma membrana de macroarray para avaliar a expressão diferencial entre dois genótipos com maior e menor eficiência na FBN: SP70-1143 e Chuneé (*S. barberi*) respectivamente. Este experimento revelou outras duas ERFs: ScERF3 e ScERF4, mais expressos no genótipo ineficiente (Cavalcante, 2006).

Um terceiro estudo evidenciou a atuação da via do etileno na indução da resistência contra a bactéria patogênica, causadora da escaldadura da folha, *Xanthomonas albilineans*

por *G. diazotrophicus* (Arencibia e cols., 2006). A técnica de cDNA-AFLP foi utilizada para obtenção de fragmentos diferencialmente expressos entre plantas inoculadas com ambas as bactérias. Dos 47 fragmentos, 12 (25%) mostraram-se pertencer à via do etileno: dois possíveis receptores e 10 possíveis ERFs, levando a crer que *G. diazotrophicus* seja capaz de induzir uma resposta semelhante à RSI na cana-de-açúcar, conferindo resistência a alguns patógenos, através da via regulatória do etileno.

Uma vez que a resposta mediada por etileno, amplamente conhecida por sinalizar defesa contra patógenos, parece também estar associada à interação, é provável que ela cumpra o papel de regular o número de células bacterianas nos tecidos da planta, impedindo o consumo excessivo de açúcares, e multiplicação descontrolada, que pode causar o aparecimento de doença. É de grande interesse, portanto estudar o papel desta via na associação uma vez que esta pode se tornar um instrumento para a diminuição da utilização de pesticidas e adubos nitrogenados, melhorando a produtividade das culturas.

A EMBRAPA já comercializa inoculantes destas bactérias como adubo biológico, mas os ganhos em plantios diferentes de cana são inconsistentes. A eficiência da associação parece depender do cultivar de cana e do solo utilizados (Baldani e cols., dados não publicados). Uma vez que a via do etileno, bem como alguns dos genes envolvidos na interação, também parecem responder a estresse hídrico (Wang e cols., 2004; Wu e cols., 2008; Zhang e cols., 2010), é possível que estes genes estejam envolvidos na rede regulatória endofíticos – patógeno – estresse hídrico.

1.4 Estudos prévios

Na busca por genes envolvidos no mecanismo de reconhecimento e estabelecimento de uma interação eficiente entre a cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas, o projeto de pesquisa no qual este trabalho se encontra inserido identificou a regulação transcricional de fatores de transcrição responsivos a etileno em três modelos experimentais diferentes: ScERF1 (TC91393) e ScERF2 (TC92596) foram identificadas como preferencialmente expressas em bibliotecas de plântulas inoculadas do projeto do transcriptoma de cana-de-açúcar (Cavalcante e cols., 2007), ScERF3 (TC80350) e ScERF4 (TC72998) foram identificadas como preferenciais de raízes (Cavalcante, 2006), e ainda outros três fragmentos diferencialmente expressos, denominados nesse trabalho de ScERF6 (TC74504), ScERF7 (TC98673) e ScERF8 (TC91554) foram identificados através de uma análise de cDNA-AFLP de plântulas protegidas por *G. diazotrophicus* da doença causada pela inoculação do patógeno *X. albilineans*. (Arencibia e cols., 2006). Também foi identificado no SUCEST um cluster homólogo aos ERFs de cana-de-açúcar, chamado ScERF5 (Cavalcante, 2006), mas que por não demonstrar regulação, na associação, ou preferencial em algum tecido não foi incluído neste estudo.

A complexidade genômica dos cultivares comerciais de cana-de-açúcar, aliada ao grande tamanho da família gênica das proteínas AP2/ERF leva a um número grande de possibilidades funcionais para estes genes. Torna-se relevante, portanto, identificar os subgrupos aos quais estes genes podem pertencer para tentar inferir possíveis funções biológicas. Uma vez que o principal mecanismo conhecido de regulação da expressão de ERFs é através da transcrição promovida por fatores como EIN3 (Figura 1) (Etheridge e cols., 2005; Stepanova e cols., 2009), o estudo da expressão dos ERFs através da quantificação de RNAm é uma boa maneira de avaliar a expressão destes genes.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Caracterizar a regulação de fatores de transcrição ERF, da via de resposta ao etileno, na associação entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas visando identificar possíveis marcadores moleculares para interação eficiente.

2.2 – Objetivos específicos

- Classificar filogeneticamente sete ERFs de cana-de-açúcar selecionadas, responsivas à interação com bactérias diazotróficas endofíticas.
- Avaliar a participação desses ERFs na via de resposta ao etileno e em resposta a sinalizadores de RSI.
- Caracterizar a regulação da expressão gênica dos sete ERFs em plantas inoculadas com diferentes bactérias diazotróficas endofíticas benéficas, comparando o padrão de resposta à bactéria não-patogênica (*G. diazotrophicus*), com a resposta a bactéria com potencial patogênico (*H. rubrisubalbicans*) e seus mutantes não patogênicos.
- Comparar a regulação da expressão gênica dos sete ERFs em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas benéficas e bactéria patogênica (*X. albilineans*).
- Estudar a regulação da expressão dos sete ERFs durante a promoção da defesa por *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans*.
- Verificar a resposta destes genes ao estresse do tipo abiótico através da indução de um estresse osmótico.
- Investigar o padrão de expressão das sete ERFs durante fases do desenvolvimento da cana-de-açúcar propagada vegetativamente.

- Investigar diferenças de regulação da expressão gênica dos sete ERFs durante o desenvolvimento vegetal, em genótipos que se associam eficiente (SP70-1143) e ineficientemente (Chunee) com as bactérias diazotróficas.
- Aprimorar o sistema de inoculação de cana-de-açúcar com bactérias endofíticas, para obter condições mais próximas do estado fisiológico da planta e amostras fisiologicamente significantes de raiz.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Análise das seqüências dos ERFs

Seqüências deduzidas de aminoácidos foram analisadas usando BLAST2seq (Tatusova e cols., 1999) para determinar a porcentagem de similaridade entre as seqüências. Os programas Pfam (Bateman e cols., 2004) e SMART (Letunic e cols., 2004) foram utilizados para identificar as estruturas dos domínios protéicos.

Alinhamentos de seqüências foram realizados utilizando o programa CLUSTALX (Thompson e cols., 1997). Análises filogenéticas foram conduzidas usando a versão 4 do programa MEGA (Kumar e cols., 2001) baseado no método de Neighbor-Joining. O teste de bootstrap (2000 réplicas) foi utilizado para acessar a confiabilidade dos ramos gerados. A visualização das árvores filogenéticas foi feita utilizando o programa Tree Explorer do MEGA.

3.2 – Preparação do material vegetal

3.2.1 – Micropropagação e enraizamento de plantas de cana-de-açúcar crescidas *in vitro*

Plantas de cana-de-açúcar das variedades SP70-1143, livres de microorganismos, obtidas por cultura *in vitro* de meristemas estéreis, foram fornecidas pela COPERUCAR (Piracicaba, SP), para micropropagação e enraizamento em câmara de crescimento vegetal.

Para a micropropagação vegetativa, perfilos das plantas foram separados individualmente e colocados em recipientes de vidro com meio de multiplicação Meio MS (Murashige e cols., 1962), 2% de sacarose, 150 mg/L de ácido cítrico, com pH ajustado para 5,7 com NaOH. Após esterilização em autoclave por 15 minutos a 120 °C, 1 atm, adicionou-se os reguladores de crescimento: cinetina a 0,1 mg/L, e 6-benzilaminopurina a 0,2 mg/L. As

plantas permanecem durante aproximadamente um mês no meio até terem em torno de 10 cm de altura e uma média de 10 perfilos.

Para o enraizamento, os perfilos das plantas cultivadas *in vitro* foram separados individualmente e colocados em recipientes de vidro contendo meio de enraizamento Meio MS (Murashige e cols., 1962), 2% de sacarose, 150 mg/L de ácido cítrico, com pH ajustado para 5,7 com NaOH. Após esterilização em autoclave por 15 minutos a 120°C, 1 atm, adicionou-se os reguladores de crescimento: cinetina a 0,1 mg/L, e ácido indolbutírico a 0,2 mg/L. As plantas permaneceram durante aproximadamente um mês no meio até terem cerca de 10 cm de altura, 4-6 perfilos e o sistema radicular desenvolvido.

Todas as plantas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com uma irradiância de $60 \text{ mmol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 12 h por dia, provido por lâmpadas do tipo branca-fria.

3.3 – Tratamentos das plantas com microrganismos

3.3.1 – Inoculação das plantas de cana-de-açúcar propagadas *in vitro*

As plantas multiplicadas *in vitro*, livres de microorganismos, provenientes do meio de enraizamento, foram transferidas para um meio de multiplicação diluído 10 vezes, sem hormônios, e mantidas por uma semana até o momento das inoculações. Bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL5) foram cultivadas em meio DYGS (2 g/L de glicose, 1,5g/L de peptona, 2,0 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 g/L de ácido glutâmico, pH 6,0) sob agitação (120 rpm) a 28 - 30 °C. As cepas de *H. rubrisubalbicans* M1, TSN e TSE foram crescidas nas mesmas condições descritas acima, porém o meio DYGS foi acrescido de 5 g/L de ácido málico. *G. diazotrophicus* foi

fornecida pelo Dr. Ivo Baldani, EMBRAPA, CNPAB, Seropédica, RJ e as cepas de *H. rubrisubalbicans* pelo Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, UFPR, Curitiba, PR.

Na inoculação foram utilizadas 150 µl de bactérias em uma DO₆₀₀ de 0,6. As inoculações foram realizadas em fluxo laminar no meio de cultura dentro dos recipientes onde a planta foi cultivada. As plantas controle foram inoculadas com o meio de cultura de bactéria sem bactéria. As plantas pertencentes ao grupo controle sofreram os mesmos tratamentos, com meio de cultura estéril. Todas as plantas foram mantidas por uma semana em co-cultivo na câmara de crescimento vegetal após as inoculações.

3.3.2 – Inoculação com patógenos

Plantas de cana-de-açúcar da variedade SP70-1143 multiplicadas *in vitro*, livres de microorganismos, provenientes do meio de enraizamento, foram transferidas para um meio de multiplicação diluído 10 vezes, sem hormônios, e mantidas por uma semana até o momento da inoculação. Esta foi conduzida a partir da abertura de feridas nas raízes e no cartucho foliar, seguida de imersão das plantas em meio de cultura contendo bactérias da espécie *Xanthomonas albilineans* (responsável pela doença da escaldadura foliar) em fase exponencial de crescimento com DO₆₀₀ 0,6. O meio utilizado para a *Xanthomonas albilineans* foi o meio Willbrink (Dye, 1980). Após as inoculações as plantas foram mantidas na casa de vegetação por 7 dias. As plantas coletadas foram imersas em nitrogênio líquido e mantidas em -80 °C até o momento da extração de RNA.

3.3.3 – Inoculação de plantas multiplicadas *in vitro* em meio hidropônico

As plântulas multiplicadas *in vitro* livres de microorganismos provenientes do meio de enraizamento tiveram novamente seus perfis separados e foram transferidas para uma

calha contendo meio Hoagland 0,5 ×, onde suas raízes ficaram imersas e a parte aérea sob uma cobertura plástica para aclimação por 15 dias. O meio foi trocado a cada semana.

Após o período de aclimação, as plantas, já com sistema radicular funcional desenvolvido, foram inoculadas com *G. diazotrophicus* (PAL5), cultivada em meio DYGS, através de pequenos cortes nas raízes, submersão em meio contendo DO₆₀₀ 0,6 por 5 min. As plantas do grupo controle sofreram o mesmo tratamento com meio estéril.

A inoculação com *X. albilineans*, estirpe serobar1 (responsável pela doença da escaldadura foliar), cultivada em meio Willbrink (Dye, 1980) foi realizada por pequenos cortes nas folhas, injeção na região meristemática e submersão meio contendo a bactéria DO₆₀₀ 0,6 por 5 min.

Sete dias após a inoculação, as raízes foram separadas da parte aérea e ambas congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C até a extração de RNA.

3.3.4 – Detecção de bactérias colonizando tecidos da planta

A confirmação do sucesso da inoculação cruzada com *G. diazotrophicus* e *X. albilineans* em plantas de cana-de-açúcar foi medido através de reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para genes de cada uma das espécies de bactérias. Para *X. albilineans*, foram feitas reações de *Nested* PCR, e os pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene *albl* foram:

- XaAlb2-f3 (CACACACACAATACAGCATTGCGG) e - XaAlb2-r3 (CCCAACTTACTTGAGGCTATGG), na primeira reação, e XaAlb2-f4 (CTTCTGCAGCTTGCTCGTC) e XaAlb2-r4 (GCTCAGTTACGCTCAGCTAATC), na segunda reação.

Para *Gluconacetobacter diazotrophicus*, foram feitas reações de PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam o DNA ribossomal 23S: Ad (TGCGGCAAAAGCCGGAT) e HerbaGd (GTTGGCTTAGAAGCAGCC).

As reações secundárias foram realizadas usando uma diluição de 40 vezes do produto do PCR primário. As condições das reações foram: desnaturação a 94°C por 4 min; 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, e 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 3 min. Os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados com brometo de etídio em luz ultravioleta.

3.4 – Tratamentos das plantas *in vitro* com etephon e jasmonato

Plantas *in vitro* livres de microorganismos, enraizadas, foram transferidas para um meio de multiplicação sem hormônios, diluído 10 vezes, e mantidas neste meio por sete dias a 28 ± 2 °C, com um fotoperíodo de 12 horas. Após este período, as plantas foram tratadas de quatro formas diferentes: com 20 µM de etephon, um composto que, adicionado ao meio, libera etileno; este hormônio combinado com 100 µM de ácido jasmônico; 100 µM de ácido jasmônico, e este hormônio combinado com 1 mM ácido salicílico. Após 10 horas de tratamento a uma temperatura de 28 ± 2 °C, com um foto período de 12 h, todas as plantas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70 °C para subsequente extração de RNA.

3.5 – Tratamentos de estresse osmótico

Plantas *in vitro*, livres de microorganismos, enraizadas, foram transferidas para um meio de multiplicação sem hormônios, diluído dez vezes, e mantidas neste meio durante sete dias. Após este período, as plantas foram transferidas para meio sem hormônio, diluído dez vezes com 500 mM de D-mannitol. Após o tempo de cada tratamento, as plantas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -70 °C para subsequente extração de RNA.

3.6 – Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir do material coletado em nitrogênio líquido e mantido a -70 °C, seguindo o método descrito por Logemann e cols., 1987. Todas as soluções foram previamente tratadas com DEPC 0,1% durante 16 horas.

O material foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para eppendorfs de 1,5 mL contendo 500 µl de um tampão de extração (200 mM Tris-Cl pH 7,5; 100 mM LiCl; 5 mM EDTA; SDS 1%), 250 µl de fenol e 250 µl de clorofórmio. A mistura foi agitada por 1 min e centrifugada a 20.000× g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, contendo 250 µl de fenol e 250 µl de clorofórmio. A nova mistura foi agitada por 1 min e centrifugada a 20.000 g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 volume de 6 M LiCl DEPC, e deixada a 4 °C por aproximadamente 16 horas. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuscitado com 1 mL de 3M LiCl DEPC e centrifugado a 20.000× g por 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado em 250 µl de H₂O destilada DEPC, ao qual foram adicionados 25 µl de 3 M NaOAc DEPC e 550 µl de etanol absoluto. A mistura foi incubada a -70 °C por 30 min, e, então, centrifugada a 20.000× g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com uma solução 70% etanol DEPC, sendo depois centrifugado a 20.000× g por 5 min. A solução de etanol foi descartada e o RNA precipitado foi finalmente ressuscitado em 50 µl de H₂O destilada DEPC.

Antes da síntese do cDNA, os RNAs totais foram tratados com DNaseI, para se livrar de qualquer contaminação com DNA genômico. Os RNAs foram incubados com 0,5 u de DNase μg^{-1} de RNA, no tampão da enzima (200 mM Tris-Cl pH 8,3, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, DEPC 0,1 %), a 37 °C por 10 min. O RNA foi, então, purificado pela adição de um

volume de fenol e centrifugação a $20.000\times g$ por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 volume de clorofórmio. Foi realizada nova centrifugação a $20.000\times g$ por 10 min; após o que, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O RNA foi então, precipitado, pela adição de um décimo do volume de 3 M NaOAc DEPC e 2 volumes de etanol absoluto, seguido de incubação a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min e centrifugação a $20.000\times g$ por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com uma solução 70% etanol DEPC; sendo após ressuspendido em 40 μl de H_2O destilada DEPC. O RNA foi quantificado, assim como sua pureza foi estimada, pela sua DO_{600} em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose. As soluções DEPC foram tratadas com DEPC 0,1 % por 16 h a temperatura ambiente, sendo, em seguida, autoclavadas.

3.7 – Síntese de 1ª fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o “TaqMan First-Strand cDNA Synthesis Kit” da Applied Biosystems, em reações com volume final de 30 μl , de acordo com o fabricante. 600 ng de RNA total foram desnaturados, a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, e adicionados a uma mistura contendo tampão (TaqMan RT Buffer) 1X, MgCl_2 5.5mM, dNTPs 2mM, oligonucleotídeo randômico 6-mer, 2,5mM, RNase Inhibitor 0,4 U/ μL e MultiScribe® Reverse Transcriptase 1,25 U/ μL , e incubados a 25°C por 10 min seguindo para $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min e $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Os cDNAs sintetizados foram então avolumados com água para 120 μl .

As primeiras fitas de cDNA devem ser normalizadas quanto à concentração, para que as reações de RT-PCR sejam comparáveis. Uma vez que o cDNA foi sintetizado com um Kit, se partirmos exatamente da mesma concentração de RNA e as reações forem disparadas ao mesmo tempo, a diferença no produto final é realmente muito pequena. Entretanto, é

muito difícil determinar a concentração exata de cDNA sintetizado sem uma purificação prévia, uma vez que muitos fatores, tais como presença de nucleotídeos livres e enzimas, interferem na quantificação. A 1ª fita de cDNA sintetizada foi, portanto diretamente utilizada na reação de PCR em tempo real.

3.8 – RT-PCR em tempo real

O RT-PCR em tempo real foi realizado com o kit SYBR Green PCR Master Mix, da empresa Applied Biosystems, conforme as recomendações do fabricante. Os primers usados foram desenhados na região 3' não traduzida dos genes *ScERF1*, *ScERF2*, *ScERF3*, *ScERF4*, *ScERF6*, *ScERF7* e *ScERF8* utilizando o software PrimerExpress da AppliedBiosystems: *ScERF1.fwr* (5'- TCGACGGCTCTGTGTTCTGA -3') e *ScERF1.rev* (5'- AACCAATAAACAGAGTAACCGAGTAGAAG-3'); *ScERF2.fwr* (5'-CTGCTGTACTTAGCAGCAAGC-3') e *ScERF2.rev* (5'-TGTGACACCCGACCTAACAC -3'); *ScERF3.fwr* (5'- GCTGAAGCACGCAGGATTC-3') e *ScERF3.rev* (5'-TGGTGCATCAGGAAAGTTAACCT-3'); *ScERF4.fwr* (5'-GCTGAAGCACGCAGGATTC-3') e *ScERF4.rev* (5'- TGGTGCATCAGGAAAGTTAACCT-3'); *ScERF6.fwr* (5'-CCGTGCAGTAGCTGTGGTAT-3') e *ScERF6.rev* (5'-CCAGGCCCAATGTGTACTTA -3'); *ScERF7.fwr* (5'-TGATTGGGAAGCGAGTTTGAG-3') e *ScERF7.rev* (5'-TACAGTCCAGCAGGCATAGG-3'); *ScERF8.fwr* (5'- TTCGGTACGCTCTTGTTCTGA-3') e *ScERF8.rev* (5'-TCCCCAGCGGAAAACTATTT-3').

A reação foi feita em uma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, da empresa Applied Biosystems). Em cada poço foram colocadas 5 µl da reação de primeira fita, 10 µl da solução mix do kit e 5 µl de uma mistura dos dois oligonucleotídeos a 3,6 µM cada um. Para cada reação que utilizava os oligonucleotídeos específicos para cada gene, foi feita outra com oligonucleotídeos específicos para o gene RNAr 28S, gene

constitutivo em todas as células da planta. Esta reação foi utilizada como controle positivo e como normalizador da quantidade de primeira-fita de cDNA utilizada nos experimentos. Como controle negativo, foi feita uma reação nas mesmas condições do controle positivo sem o molde de primeira fita.

Os dados obtidos foram analisados para obtenção do valor de expressão relativa apenas ao constitutivo ($2^{-\Delta Ct}$) e relativa à expressão do grupo controle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) segundo a metodologia descrita por Livak e Schmittgen, 2001.

O resultado bruto do software do PCR em tempo real é uma curva logarítmica da intensidade de fluorescência na fase inicial, que se transforma, gradativamente, num platô de saturação. Para determinarmos a quantidade precisa do produto de PCR, é imprescindível que o ponto de medição seja bem determinado. É preciso desconsiderar o sinal inicial, que pode conter fluorescência basal. Esta é muito evidente nos ciclos iniciais, antes de haver uma quantidade significativa do DNA amplificado. É baseado nestes ciclos que se determina a linha de fluorescência básica das amostras. O ponto de medição escolhido foi acima da linha de base, ainda na fase logarítmica da curva. O ponto de medição determina o número de ciclos necessários para gerar a fluorescência no ponto escolhido. Os valores obtidos são transformados para uma escala linear, utilizando-se a base 2 por serem duas fitas moldes de DNA. O resultado obtido é a quantidade de fluorescência encontrada naquele determinado número de ciclos, em unidade arbitrária. O valor da fluorescência de cada amostra com os oligonucleotídeos específicos dos genes em questão é, então, dividida pela fluorescência da amostra correspondente com o oligonucleotídeo 28S. Assim, as amostras são normalizadas pela quantidade de primeira-fita. Depois deste cálculo feito, divide-se o valor de cada amostra pelo valor da amostra controle. Deste modo obtemos o valor de quantas vezes mais

as plantas transformadas expressam os genes em questão em relação ao controle do experimento. Desta forma a fluorescência relativa pode ser expressa pela equação:

$$\text{Fl. Rel.} = 2^{-(\text{CT } 28\text{S} - \text{CT gene})}$$

Onde, **Fl. Rel.** é a fluorescência relativa, **CT 28S** é a média de número de ciclos no ponto escolhido do controle com 28S e **CT gene** é a média de número de ciclos no ponto escolhido do gene em questão.

Para expressão relativa dos experimentos com os controle experimentais, então:

$$\text{Fl. Rel.}_{\text{exp}} / \text{Fl. Rel.}_{\text{cont}}$$

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos pelos cálculos dos valores de fluorescência das reações de PCR em tempo real das réplicas técnicas distintas de todos os experimentos foram comparados através da análise de variação (ANOVA) e o teste de Tukey feito no software Graphpad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Um valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo

4 – RESULTADOS

4.1 – Classificação filogenética dos fatores de transcrição responsivos a etileno (ERFs) na interação cana-de-açúcar – bactérias diazotróficas

Foi feita uma busca pelos motivos conservados de cada subfamília de ERFs nas seqüências de proteínas deduzidas dos genes de cana-de-açúcar. A seqüência gênica, a seqüência deduzida de aminoácidos, assim como o arranjo de motivos conservados nos ERFs identificados em cana-de-açúcar são mostrados nas Figuras (1-8) que se seguem.

(A)

TCTATATAAACACCACGACCAGAACACGTAAACTAACCCAAGAAAAAACTTTCTCGGAACA**ATG**TGCGGAGGCGC
CATCCTCGCGGAGCTGATCCCGCCGACGCGGCGCGTGGCGTCGAAGCCGGTGACCGAGGGACACCTCTGGCCGGC
GAGCTCCAAGAAAGCCGGCATCGGCAGCGGCAGCAACAAGAGGCACCACCACGAATACACCGACGACGACGACTT
TGAGGCCGCTTCGAGGAGTTCGACGACGACTTTGACGCGCACGAAGACGACGAGGACCACCCGACCACTTCGT
GTTCTCCTCCAAATCCGCCTTCTCCCCAGCCCACGACGGGCGCGGTGCGCGGGCGGCGGCGACCCAAAGGACGAA
GCGCGGCCACCGCCAGTTCCGCGGCATCCGGCAGCGGCCCTGGGGCAAGTGGGCGGCGGAGATCCGCGACCCGCA
CAAGGGCACCCGCGTCTGGCTCGGCACCTTCAACACCGCCGAGGACGCGCGCCCGGGCCTACGACGTCGAGGCCCG
CCGCCTCCGCGGCAGCAAGGCCAAGGTCAACTTCCCCGACCGCGCGCGCGCGCCCGCGGGCAAGGGCAACCC
AAGAACCGCGCCGAAACCGCAGCAACACCATGCTGCTGCAGCACAGGCACTGCCCGCTCTGCTTCTTCGAGGAGA
GAAGGGGCAGGAAGGAGTTGCCGTGAAGCCTGAACTATGGACACGTTTCGACGTGGGCGAGCTTCTTCGACATGAC
CTTCCCCACCTTCCAGCCGTGCTGCCGCCGGCCATGGAGAGCTCCTTCGCCGGCAGCAGCGCCACGTCGGAGAC
CTGGAGCCCCGCAAGAAGCTGAGATACGACGACGGCGACTTGTCCGAGGGCAGCGGCGGTGGCTCCGCGCTGGA
GCTCGCTGACGAGCTGTCAATTCGATCCGTTTATGCTGCTGCAGATGCCTTACTCGGGCGGGTACGATTCCCTGGA
CGGCCCTTTTCGCCGAGAGGCCGTGCAGCAGGACGTGAACAACGACATGAACGGCGTCAGCCTGTGGAGCTTCGA
CGAGTTCCCCGTCGACGGCTCTGTGTTCT**TGA**CGTACCCTAGCTATCCGCTGTACTTCTACTCGGTTACTCTGTTT
ATTGGTTCAGGAAGGACGTTTGGCGTTCAACCAATCAACCCGGACGATCGATGCGGCTGATGGCGACTTGGAGAT
TATATTGCTTACTACTAGTACTATTTGCTGCCCGCTGGTGTGTAATCATATGTGATAGTACTGCTTGGGTTTGC
TCGTTAGATTCTGCATCTGTACTGCTGCCGGCTGCCGGCCCCCTGAGAGTCAGATTGTACTCCACTCTGAATATT
TTCACCACATAATCGTTT

(B)

MCCGA**IL**LAELIPPTRRVASKPVTEGHLWPASSKKAGIGSGSNKRHHHEYTD**DDDD**FEAAFE**EF**DD**DF**DAHE**DE**DEH
PDHFV**FSS**SAF**S**PAHDGRGARA**AA**TQRTKR**GHR****Q**FRGIR**Q**RPWGKWAA**E**IRDP**H**KGTRV**L**GT**F**NTA**E**DAAR**A****Y**
DVEAR**RL**RGSKAKV**N**F**A**AGARARRGKGNPRTAPK**P**QQHHAA**AA**QALPALLRGEKGQEGVAVK**P**ETMD**T**FDVGS
FFDM**T**FPT**F**PAVL**P**PAMESS**F**AGSSATSETWSPAKKLRYDDGDLSEGS**G**GSAL**E**LEL**S**FD**P**FML**L**QMPY**S**GG
YDSL**D**GPFA**E**AVQ**Q**DVNNDMNGVS**L**WS**F**DEFPVDGS**V**F

(C)

Figura 2 - Análise da sequência deduzida de aminoácidos de ScERF1. (A) Sequência de nucleotídeos consenso entre as 45 sequências expressas do cluster (SCCART1002D01.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Sequência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-5 (azul), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

CGAAAAGGAAAAGAAAGCTTCCAGGGCCGGAGCAAAG**ATG**TGTGGCGGTGAGATCCTCGTCGACCTCAACCCGAG
CACGCCGGCGCGCCGCATGGAGAAGCAGCGCAAGGACGACGACTTCGAGGCCGCTTTCCGGGAGTTCGATGAGGA
GGACGAGGAGATGGTGGAGTGGGACACCAAGGCCGCCCCCGCCCTTGTCTTCCGCGCCACCAAGCCCATGGCGCG
CCTGGTGCAGCAGCAGCCCGCGCCGAGCAGGCGCCGGAACCCCGCGCGGCATTACAGGGGCATCCGTTGCCGCCC
GTGGGGCAAGTGGGCTGCCGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCGTCTGGCTCGGCACCTTCCCGACCGC
CGAGGCCCGCGCGCTCGCCTACGACCACGCCGCGCGCAACATCCGCGGGTCCAGGGCCAAGCTCAACTTCCCCGC
CTCCTCCTCGTCCCACGGCGCCGCCGACGCCGTATCGACCTCGTCGAGCAAGAGGAACAAGAGCAACGCGCGGC
GGTGGCGGCGGCAGCCGTCTTGAAGCACGAGGCCGCCGAGAGGAGCTCCGGCTCTGGCGCACTCCCGGACTTCTC
GTGGCAGGGTGTGTGCGCGGCGTACGACGAGGCCCGAAGACCGAACCAGAGACACCGAAGACGAGGCGTCGCC
CCGGGCTCGGGCTCCAAGGCGGATGCGCTGTTTCGATGCGGTCCTCTTGGGCGACCAGCAGTTTGCCTTCTTCGA
CGCCGGCGCGCACGAATCACTGGACACCATGTTATTACGCGTGGACGCCGTGCAGAGCAGCGCGGCCGTGCGGGC
GGACCAGCGCATGCCGCTCTGGAGCCTCGACGACCTCGTCGAGGACAACCTGTTGTTTTAAGCTTTTCGGTTGTTG
TTTTCTAGTAGTGTGT**TGA**GATTTTGTAAATTACGACCGTTTTGTGGAGTCTCTGCTGTACTTAGCAGCAAGCCT
GTATGTATATATCAGTAAAAATGATCTATATCAGTAACAAATTAGGTTTGGTTTAGTTTCGGGATGTGAAGTTTC
TAGGTGTTAGGTGCGGTGTACATCGGATGTTACCTAGGGTGTGGGATA

(B)

MCGGEIIVDLNPSTPARRMEKQRKDDDFEAAFREFDEEDEEMVEWDTKAAPALVFRATKPMARLVQQQPAPSRRR
NPAR**HYRGIRCRPWGKWAAEIRDPVKGVRVWLGTFTAEAAALAYDHAARNIRGSRAKLNFP**ASSSSHGAADAVI
DLVEQEEQEQRAAVAAAVLKHEAAERSSSGSGALPDFSWQGVSAAYDEAPKTEPESTEDEASPRASGSKADALFD
AVLLGDQQFAFFDAGAHESLDTMLFSVDAVQSSAAVAADQRM**LWSL**DDLVEDNLLF

(C)

Figura 3 - Análise da sequência deduzida de aminoácidos de ScERF2. (A) Sequência de nucleotídeos consenso entre as 3 sequências expressas do cluster (SCACHR1038D01.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Sequência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-5 (azul), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

CATTGTAATAAATTAGCTCACCTAGAACAAACCAATTGTAGTACAAATATGCAAGCACAACTTGACTGCATTAA
 GTCATTAGCCGAAGCTATCACCCACCCCTGTATCCCCCATCTCCATTGTTAGGTTCTTGGCTACAATTCTTGCC**A**
TGTTGCGGCGGGGCCATTCTCAGTGATCTCTACTCGCCAGTTAGGCGGAAGGTTACTGCCGATGACCTATGGACAG
 AGAGTGGCAGCAATAAGAGTGGGAAGAACTGGAAAAGGAAGAGTTCTTGGGAGTTTGGTGAAGACGATAACGATG
 ACTTTGAGGCTGATTTTCGAGGGATTTGAGGATGGTGATAGCGAGGAAGATGAGTTCCAAATGAACAGTTTCGAATC
 TCGTGGTGGGTTTCAATGTTTCACTGCCAAAGTGGGCAGCAGGAAGAGAAGGACACAGTATCGTGGGATCCGGC
 GGCGCCCTTGGGGCAAATGGGCAGCTGAGATCAGAGACCCATGCAAGGGCGTCCGAGTGTGGCTTGGCACCTACA
 GCACCGCTGAAGAGGCTGCAAGAGCCTATGACATGGCAGCCTGGCGCATACGTGGCAAGAAAGCCAAGGTGAACT
 TCCCCGACGCCATCACACATCCCGAGAAACGCCACCGGGGGCGTGTGACTCGACCAGGAAAGAAGATTACGTCAC
 AGGAGGTGCTGAAGCTTGACGGCACCTCTGTTCGATCATGTCATCTCAGCTGGCAGCAGCACCGAT**TGACT**GACCAC
 CGTCGTC

(B)

MCGGAILSDLYSPVRRKVTADDLWTESGSNKGKNWKRKSSWEFGEDD**NDDFEADFEGFEDGDSEED**EFQMNSSN
 LVVGFNVHTAKVGSRRRT**DYRGIRRRPWGKWAAEIRD**PCKGVRVWLGTYSTAEAAARAYDMAAWRIRGKKAKVN
 FPDAlTHPEKRHRGRVTRPGKKITSQEVLKLDGTSVDHVISAGSSTD

(C)

Figura 4 - Análise da seqüência deduzida de aminoácidos de ScERF3. (A) Seqüência de nucleotídeos consenso entre as 4 seqüências expressas do cluster (SCQSRT1036G02.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Seqüência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

GACCCACGCGTCCGCGGACGCGTGGTTTCGCTCTCGCAAGCCACCGATTTGTTTACTGCTCGCTCCGGCGCGCTG
 CGGCGGAGCTACCGACGACGACTGAGCC**ATG**TGCGGCGGCGCGATCCTCGACGACCTCCGCGAGCCGGAGCTGCG
 CCGGGTCACGGACCGGGACATCTGGCAGAAGAAGAAGCCCAAGAGGGGCGGCGGCGGCGGAGGCGCTCGTTTCG
 GCGGAGGACGATGAGGACTTCGAGGCCGACTTTGAGCACTTCGAGGCTGACTCCGGCGATTTCGGATTTTGAGCT
 CGGGGAAGGGGCTGACGACGACGTCGTCGAGATCAAGCCCTTCGCCGCCAAGGGGACTTTCTCCAGAGATGGCTT
 AAGCACCATGACTACTGCTGATTATGATGCCCCCTGTGGCAAGGTCAGCCAAAAGGAAGAGAAAGAATCAATACAG
 GGGTATCCGCCAGCGCCCTTGGGGCAAGTGGGCTGCTGAGATCAGAGATCCTCAGAAGGGTGTTTCGTGTTTGGCT
 TGGTACTTTCAATAGTCCTGAGGAAGCTGCAAGAGCTTATGATGCTGAAGCACGCAGGATTTCGTGGCAAGAAGGC
 CAAGGTAACTTTTCTGATGCACCAGCAGTTGGTCAGAAGCGCCGTTCTGGCTCAGCTTCTGCTAAAGCACCCAA
 GTCAAGTATTGAACAGAAGCCTGTCGTCAAAGCAGCTATGACCAACCTTGCCAACACAAATGCATCCTTCTACCA
 ATCTGTAACTACCCCTCCAACAATCCATTTGTTTCAGCATGCCAATATGCCATTTCGTTCCAGCAATGAACTTTAC
 TGCTTCTGTTGAGGATCCCATCATGAATCTGCACTCTGACCAGGGAAGTAACTTCTTTGGCTGCTCAGACTTGGG
 CCTGGGAGAA**TGA**TACCAAGAC

(B)

MCGGAILDDLREPELRRVTDRDIWQKKPKRGGGGRRSFAAED**DEDFEADFEHFEADSGDSD**FELGEGADDDVV
 EIKPF~~AAKGTFSRDGLSTMTADYDAPVARSAKRKRKN~~**QYRGIRQRPWGKWAAEIRD**PQKGVVWLGTFSPEEA
ARAYDAEARRIRGKKAKVNFEDAPAVGQKRRSGSASAKAPKSSIEQKPVVKAAMTNLANTNASFYQSVNYPSNNP
 FVQHANMPFVPAMNFTASVEDPIMNLHSDQGSNFFGCSDLGLGE

(C)

Figura 5 - Análise da seqüência deduzida de aminoácidos de ScERF4. (A) Seqüência de nucleotídeos consenso entre as 4 seqüências expressas do cluster (SCCCLR1067G09.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Seqüência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

CGGACGCGTGGGCCGCATTTCCGCTTCCGCTTCCGCATCACGCAGACAAGCAAAGCTAGCTAGCGACCAACCCAC
 CGCCCGCGAGCTCAGATTTCCCTTCGCCTTGCGCACCGTCCCGTTTCGGTTTCGCTCCAGCCCCGCGCCCCACACAG
 CCCAGCGAGCGCTGCCAGCAGCAGCCAGCC**ATG**TGCGGCGGCGCCATCCTGTCCGACATCATCCCGCCGCGCG
 GCGGGTCACGGCGGGCCACCTCTGGCCGGAGAGCAAGAAGCCGAGGAGGGCCGCCGGAGCCGGCAGGAGGAGGGC
 CCCCCTGGAGGAGGAGGAGGAGGACTTCGAGGCCGACTTCGAGGTGTTTCGAGGTGGAGTCCGGCGAGTCCGAGCT
 CGAGTCCGAGGATGAGGCCAAGCCCTTCGCTGCGCCAGGAGCGGGTTCGCTAGAGATGGATTAAACACTAGTCC
 AGCTGGTGTGATGGCCCTGCTGCAAATTCAGTTAAAAGGAAGAGGAAGAACCAGTTTAGGGGTATCCGCCGGCG
 CCCATGGGGTAAATGGGCTGCTGAGATCAGAGATCCTCGCAAAGGCGTTTCGTGTCTGGCTTGGTACTTTCAACTC
 TCCTGAAGAAGCTGCTAGAGCTTATGATGCTGAGGCACGCAGGATCCGTGGCAAGAAGGCTAAAGTCAACTTCCC
 AGATGAGTTTTCAACGATTTCTCAGAAGCACCGTGTGGGCCCTACCTCTCTGAAAGTGCCTGAGATGGACGTTGA
 AGAGAAGCCGATTATCAAGATGGCCAACTCAAATGCATATCACTACCCTGTTGTGCGCCACAACATGCCTGAGCC
 ATTTATGCATACTCAAAACATGTCATTTGCTCCTTTGGTGAATTCTGCCGCCCCCGTTTCAGGAACCTTTTCGTGAA
 CCTGTCTTCCGACCAAGGTAGCAACTCCTTCAGTTGCTCAGACTTCAGCCTCGAGAATGACACCAGGACCCCTGA
 CATAACATCGGTAGTTGTTGGTGAGTCTGCATTGCGCCAGAACGCAGATCATGCTGTGGTGCCTCCTGTGATGGG
 GAATGCTAGTGTTGATCTCACAGAGTTGGAGCCGTATATGAATTTCTGATGGACAGTGGTTCAGAGGACTCAAT
 CGACACCCTTTTCAGCTGTGATGGATCCCAGGACGTGGTTAGCAACATGGACCTTTGGAGCTTTGATGACATGCC
 CATGTCTGCTGGTTTCTAC**TGA**GGTTGAGGCCCCAGCGACTGGTGCTTGTACATAGGGGACAAAGGGAATAATGT
 TCTGGAGATGATGAAGAAACGCTTGTGTGGCGTGCTGCAGCCGTGCAGTAGCTGTGGTATTAGTATATGCTTAG
 ATGTTCACTCACTTTCTTAAGTACACATTGGCGCTGGACATGTACCTTATTTTACTATGTATCCGTGACAACAAC
 TATGTGTCTGCTCGTTTTTGTTCCTGCTTTTACTTCAAATGGCTCTGAACATTGCGAGTTTGTAGCCAATATA
 TGTATCTGTATGTGCTTGGTTTGCTATTAGTCTAGTTTCATCCTTCGCAGCAATGTGATAGTCTTTTGTAGGCATG
 CATGTGCGCGCAGCACGTCTATGAAAAACATTCCTTCGAAATAGATGAATAATAGCAATCAAATGTCTTCATAAT
 GGATGAATAACAACCTTTTTTTTTTTTAGAAGTCAGTTTCTTGAATCCTTGATGCATGCATATGGTCTAGGAT

(B)

MCGGATLSDIIPPPRRVTAGHLWPESKKPRRAAGARRRAPVEEEE**EED**FEADFEVFEVESGESELESEDEAKPFA
 APRSGVARDGLNTSPAGVDGPAANSVKRKRKN**QFRGIRRRPWGKWAAEIRDPRKGVRVWLGTFN**SPEEAARAYDA
EARRIRGKKAKVNFDEFSTISQHRAGPTSLKVPEDMDVEEKPIIKMANSNAYHYPPVGHNMPEPFMHTQNMSFA
 PLVNSAAPVQEPF**VNLS**DQGSNS**FS**CS**DF**SL**END**TR**TPDITS**VVGESAFQAQNAHAVVPPVMGNASVDLLE
 PYMNFMDSGSEDSIDTLFSCDGSQDVVSNMD**LWSFD**DMPMASGFY

(C)



Figura 6 - Análise da sequência deduzida de aminoácidos de ScERF6. (A) Sequência de nucleotídeos consenso entre as 45 sequências expressas do cluster (SCBGLR1023H03.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Sequência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-4 (roxo), CMVII-7 (amarelo), CMVII-5 (azul), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

CACGAGCCCCACCCCAATTCTTCGCTCACCAGAGGCCAGAGGGCAGCCAAAGCCGAGCCGCAACCACAAAGAT
 CTTGCCTGGCCTCCGTTTCTCCCAGCTCGTCACTGTGCCGCTCGTGCCCTCCACTCCCCCGGTCCGCCACACCAA
 TAATCCATCCACCACCACCCCGCTGCGGGG**ATG**TGCGGCGGCGCCATCCTCTCGGGTTTCATCCCGCCGTCCGGG
 GTGGCGGCGGCGGCCGCCAAGAAGAAGCAGCAGCGGCGTGTGACGGCGGACCTGCTGTGGCCGGGGCCCGGCAAG
 AAGGGAGCGCCCCAGGAGGAGGAGGACGACTTCGAGGCCGACTTCCGCGAGTTCGAGCGCGGCCTCAGCGAGGAT
 GACGTGGACGGCGCCGCGAAGGCGGCGACGACGAGGTCCAGGAGCTTCTCCGCGGAGCCGGCGAGGTTTGCC
 TTCGCCGCGCGGCTAAGGCGCGCGCCCTGCAGTTGATGGTGTGATGACTCCAAAGAATGTTCAAGGAGATAGA
 CCTACTGCTAACTCGGTAAAGCGCAACCGGAAGAATCAGTACAGGGGAATCCGCCAGCGCCCTTGGGGCAAATGG
 GCAGCTGAAATCAGAGACCCTAGCAAGGGTGTCCGTGTTTGGCTTGGAACCTACAACACTGCTGAGGAGGCAGCT
 AGGGCATATGATGCTGAAGCTCGCAAGATCCGTGGAAAAAAGCGAAGGTCAATTTTCTGATGAAGTGCCAGGT
 GCTCAGAAGTCAACTGCAAAGCCAACTGCTGCGAATGCAACAAAGCTAGCTCTTCCCCAAAGGCCTGTGCTGAT
 GAGGTTTTCAATAACCTGAGCAATGACAACATGATTTGTTGCGAATGTTTGC GTTCAATGACAATAAGGTTCTCT
 GTGAAGCCAGCTGAGGGTGCCAGTTTCTCCCTTCAGTGAAACCTCTGGTGCCCAATAAGAGATCTGCGACTAAC
 ATGCTCTCTGATCAGAGCAGCAACTCCTATGGCTCTTCTGACTTTGGGTGGGACGATGACACCATGACCTCAGAC
 TACACCTCAGTCTTTGCTCCCAATAATGTTATACCAGCATCTTACATGCAAGGTGGAGTGTCAAAGAGAATGAGG
 AACAACTATGGTGTAGCCATGCTTCAGGGAAATGGCGAGCCCTGTCTCGCGCAAGTCATGGCTGGTTTTGATCCT
 GAGATGAACTATCAGCCATCAGATGCATCAATCGAGCAAACCTGATATTCACAGGATGGGGCAAGCAATGGGGAT
 ATCTGGAGCCTTGATGAGCTGCTCATGGCAGCTGGTGCTTAT**TGA**GAAGCTATGGTTATTATCAATGTGGTGTGT
 TGACAGCAAAAAATGTCTCTTACCTGTGGTGTATGCCGAGAGGCAGTTGTATCCGCTACGTTTTCTCGCGGTAGT
 TATATATGGTAGATTACATATATATGCTTTTGCCAGTTGAACTCTACCTATGACAATGTCTATAGTATGTTGCTG
 CATGGTGCATCTATGATTGGAAGCGAGTTTGAGACTTATTCATAAATTTACCTTGCCCTATGCCTGCTGGACTGTA
 GTGTGATGTTATGTATGTATATATATATGGTGTGCTTGTATATTGCAATACTTTATCTGGAAGCACACGATTTTCG
 CTTTCCTAAACAAATAGACCATGTAANGCA

(B)

MCGGAILSGFIPPSGVAAAAAKKKQRRVTADLLWPGPGKKGAPQEE**EDDFEAD**REFERGLSEDDVDGAGEGGD
 DEVQELPPPEPARFAFAAAAKAPRPAVDGVMTPKNVQGDRPTANSVKRNRKN**QYRGIRQRPWGKWAAEIRDPSKG**
VRVWLGTYNTAEAAARAYDAEARKIRGKKAKVN**FE**DEVPGAQKSTAKPTAANATKLALPPKACADEVFNNLSNDN
 NDLFAMFAFNDNKVPVKPAEGASFLPSVKPLVPNKRSATNMLSDQSSNSYGSSDFGWDDDTMTSDYTSVFAPNNV
 IPASYMQGGVSKMRNNYGVAMLQNGEPCLAQVMAGFDPEMNYQPSDASIEQTDIPQDGASNGD**ILWS**DELLMA
 AGAY

(C)

Figura 7 - Análise da sequência deduzida de aminoácidos de ScERF7. (A) Sequência de nucleotídeos consenso entre as 45 sequências expressas do cluster (SCQGLR1019D12.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Sequência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVII-1 (vermelho), CMVII-5 (azul), CMVII-6 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

(A)

CTCCCACCTCAAATCCCAGACGCCACCAGACGCCACCCATCCATACTCACACGCACGCGCTTCCCGCTGTTCTCT
 CCGCAAAAGAAAAGAAAACGAGGCC**ATG**GCGCCAAGAAGCTCAGAGAAAACGATGACACCGGCGGCGGGCGG
 CCACGGGGCTCGCGCTTAGCGTCGGCGGCGGAGCCGGAGCCGGCGGCCCCGCACTACAGAGGCGTCAGGAAGCGGC
 CGTGGGGCCGGTACGCAGCGGAGATCCGCGACCCGGCTAAGAAGAGCCGCGTGTGGCTCGGCACGTTTCGACACGG
 CCGAGGAGGCCGCGCGCGCTACGACGCCGCGCGCGAGTACCGCGGCGCCAAGGCCAAGACCAACTTCCCTT
 TCCCTTCGTGTCATGACACTCGCCGCGCGCGGAGCCGGCACCTTGCCCGCGGCGGCGGCGGCGTCA
 CCGGCGGCGGCGAGCCGGAGCAGCAACAGCAGCACCGTCGAGTCATTTCAGCGGCGGCGAGCGACGTGCAGGCGGCGC
 CCATGCAGGCCATGCCGCTCCACCGTCGCTCGAGCTCGACCTGTTCCACCGCGCGGTGGCCGCGGGCACGGGCG
 CCGGCGGCGGCGCGGTACGCTTCCCTTTCAACAGCTACCCCGTGACGCACCCGTACTATTTCTTCGGGCAGGCCG
 CGGCTGCCGCGGCGAGGGTGCCACATGCTCAAGCTGGCACCGACGGTGACCGTGCGGCGCGTGGCGCAGAGCG
 ACTCCGACTCCTCGTCGGTCGTGGATCTGTGCGCGTCGCGCGTGCGCGCGGTGTCGACGACGAAGGCCGCGCGT
 TCGACCTTGACCTGAAGTCCCCGCCGCGGCGGAGGCGGAGGCC**TAG**TCGCGGAGTTTTTAGCTGAAAAATGA
 CTGCATGTAGTTTCTTCTTTCTTTTTTTTTTTCTTTCTTCGCTTTTCCCCGTAGAGGAAAATTCGGTACGCTC
 TTGTTGACAGAGGGTAGGGAGGTCATTTTTGTAAATAGTTTTTCCGCTGGGGACCTAGCTTTTGCTGATGATGA
 TAAAAGCTTGATTGT

(B)

MAPRTSEKTMTPAAAGATGLALSVGGGAGAGGP**HYRGVRKRPWGRYAAEIRDPAKKSRVWLGTFTDAEEAARAYD**
AAAREYRGAKAKTNFPFPSSCMTLAAGAGAGTGTLPAAAAVTGGGSRSSNSSTVESFSGSDVQAAPMQAMPLPP
 SLELDLFHRAVAAGTGAGGAAVRFPFNSYPVTHPYFFGQAAAAAAGCHMLKLAPTVTVAAVAQ**SDSDSSSVVD**
 LSPSPLAAVSTTKAAAFD**LDLNCPPFAEAEA**

(C)

Figura 8 - Análise da seqüência de deduzida de aminoácidos ScERF8. (A) Seqüência de nucleotídeos consenso entre as 4 seqüências expressas do cluster (SCQSRT1036G02.g) com os códons de iniciação e término sublinhados e em negrito. (B) Seqüência deduzida de aminoácidos codificada pelo cDNA respectivo com os motivos CMVIII-1/EAR (ERF-associated amphiphilic repression) (cinza), CMVIII-2 (cinza) e o domínio AP2 (verde), grifados. (C) Representação gráfica da proteína, seu domínio AP2 e motivos identificados.

A análise das seqüências dos ERFs identificados revelou que estes possuem ao menos dois motivos conservados das subfamílias as quais eles pertencem sendo os domínios CMVII-1 e CMVII-6 presentes em todas as seqüências deduzidas pertencentes à subfamília VII. ScERF8 apresentou os motivos CMVIII-1/EAR (ERF-associated amphiphilic repression) e CMVIII-2, característicos da subfamília e necessários para a repressão transcricional de promotores GCC-box, característico de genes relacionados à defesa como PDF1.2, Thi2.1 e PR4 (McGrath e cols, 2005).

Para caracterizar filogeneticamente os ERFs identificadas em estudos anteriores, foi montada uma árvore contendo dois ou três membros de cada um dos subgrupos da família AP2/ERF em *Arabidopsis*, modelo no qual existem mais trabalhos publicados a respeito desta família gênica (Fujimoto e cols., 2000; Pan e cols., 2001; Li e cols., 2004; Ogawa e cols., 2005; Nakano e cols., 2006; Welsch e cols., 2007; Blödner e cols., 2007; Li e cols., 2008). Os resultados da análise filogenética, por neighbour-joining, revelaram que das sete ERFs possivelmente envolvidas na interação cana-de-açúcar – bactérias endofíticas, caracterizadas nesse trabalho, seis pertencem a um mesmo subgrupo, o subgrupo VII, como pode ser visto na Figura 9.



Figura 9 - Árvore filogenética com base nos ERFs de *Arabidopsis*. Feita com as seqüências de aminoácidos deduzida, dos membros de todos os subgrupos da família AP/ERF de *Arabidopsis thaliana* e os ERFs possivelmente envolvidos na interação cana-diazotróficos (circulados em vermelho) no programa MEGA4. Para avaliar o limite de confiança dos ramos internos da árvore, uma análise de bootstrap com 2000 replicatas foi realizada. Os números próximos dos nós são as percentagens de bootstrap. Números de acesso: DREB1A (BAA33434.1), DREB1B (BAA33435.1), DREB1C (BAA33793.1), DDF1 (NP_172721.1), DDF2 (NP_001077764.1), TINY (AAC29139.1), TINY2 (NP_196720.1), RAP2.10 (NP_195408.1), CEJ1 (NP_190595.1), ABI4 (AAD25937.1), DREB2A (NP_001031837.1), DREB2B (BAA36706.1), RAP2.4 (NP_177931.1), SHIN (Q9XI33.1), ERF14 (P93822.1), ERF2(EREBP2) (NP_199533.1), ERF5(EREBP5) (NP_568679.1), ERF1 (NP_188965.1), ERF6 (Q8VZ91.2), ABR1 (NP_201280.1), RAP2.6 (AAC36019.1), RAP2.3 (AAC49769.1), At2g47520 (AAC62858.1), At1g72360 (AAP13367.1), RAP2.2 (NP_850583.1), RAP2.12 (NP_001077718.1), JERF3 (ACF74903.1), AP2 (ACB30786.1), ERF10 (NP_171876.1), ERF3(EREBP3) (NP_175479.1), ERF7 (NP_188666.1), ERF12 (NP_174158.1), ERF8 (NP_175725.1), ERF11 (NP_174159.1), ERF4(RAP2.5) (NP_188139.1), ERF9 (NP_199234.1).

As seqüências de proteínas deduzidas a partir das ESTs presentes no banco de dados do SUCEST de ScERF1, ScERF2, ScERF3, ScERF4, ScERF5, ScERF6 e ScERF7 agruparam juntas aos representantes da subfamília VII de proteínas AP2/ERF de *Arabidopsis*. A presença da grande maioria destes genes nesta subfamília sugere um possível papel desta na interação entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas. Foram descritos para este subgrupo, além do domínio AP2, oito motivos conservados sem função biológica conhecida (Nakano e cols., 2006). ScERF8 foi agrupada com membros da subfamília VIII. São característicos desta subfamília os motivos CMVIII-1 e CMVIII-2, os quais já foram descritos por inibir a transcrição de genes GCC-box em arroz, *Arabidopsis* e tabaco (Fujimoto e cols., 2000; Ohta e cols., 2001; Tiwari e cols., 2004).

Na busca de mais informações funcionais a respeito dos ERFs foi feita uma árvore com todos os membros do subgrupo VII de *Arabidopsis*, modelo que possui genoma melhor anotado; arroz, um dos modelos de monocotiledôneas também com genoma em estágio avançado de anotação; sorgo, planta com genoma seqüenciado mais próximo filogeneticamente de cana e todos os ERFs do subgrupo VII já descritos desta subfamília em outras plantas: CaPF1 (pimenta, *Capsicum annuum*) (Tang e cols., 2005), HvRAV (cevada, *Hordeum vulgare*) (Jung e cols., 2007) e SIJERF3 (tomate, *Solanum lycopersicum*) (Wu e cols., 2008; Zhang e cols., 2010). A árvore filogenética obtida é representada na Figura 10.

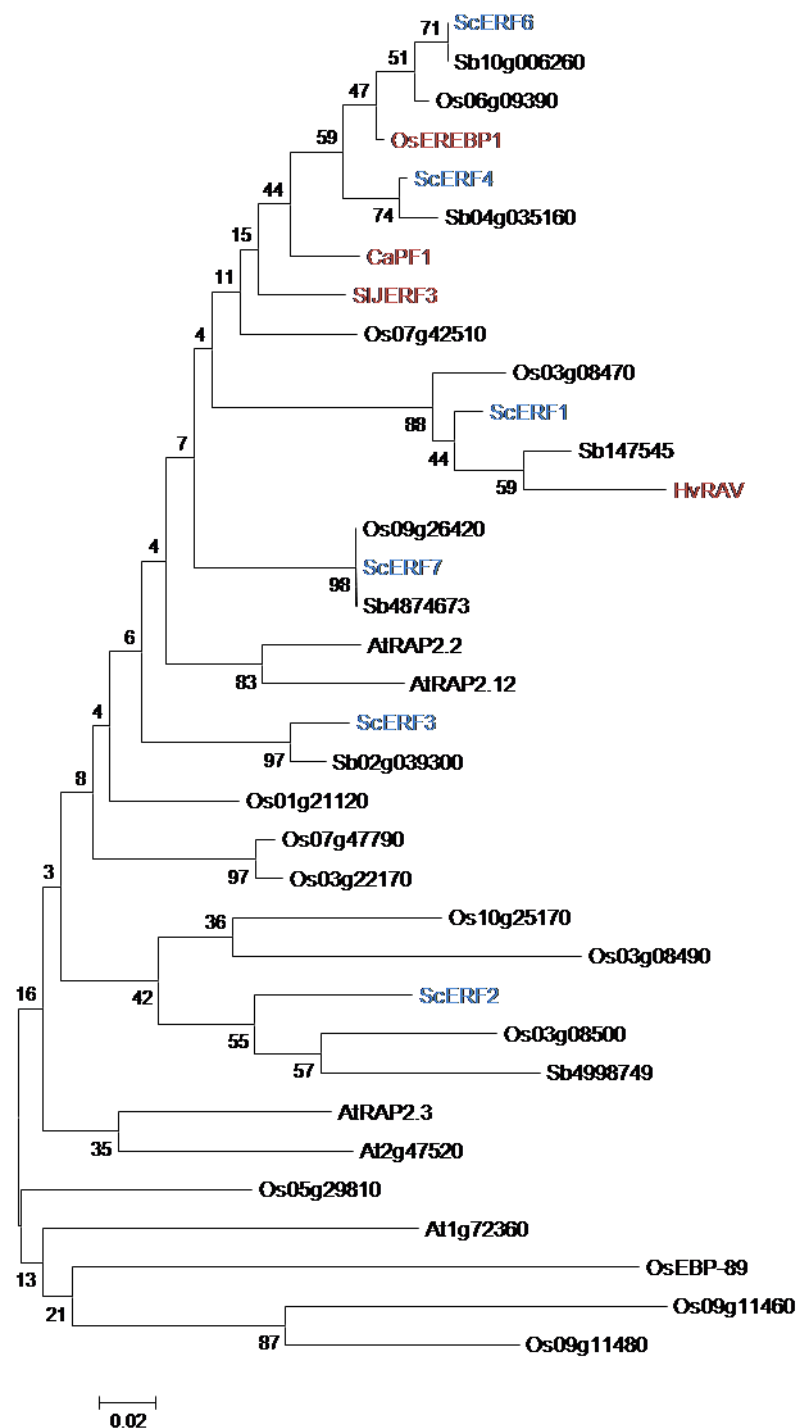


Figura 10 – Árvore filogenética dos ERFs da subfamília VII. Análise feita no programa MEGA4, com as seqüências de aminoácidos deduzidas, de todos os membros da subfamília VII de Arabidopsis, arroz, sorgo, os ERFs possivelmente envolvidos na interação cana-diazotróficos (azul) e alguns outros ERFs com função já descrita na literatura (vermelho). Para avaliar o limite de confiança dos ramos internos da árvore, uma análise de bootstrap com 2000 replicatas foi realizada. Os números próximos dos nós são as percentagens de bootstrap.

O gene de função conhecida que agrupou mais próximo a ScERF4 e ScERF6 foi OsEREBP1, um ERF de arroz, que pode ser fosforilado por uma MAPK e nessa circunstância tem sua afinidade por DNA aumentada, promovendo a expressão de genes ligados a patogênese (Cheong e cols., 2003). Também filogeneticamente próximos a estes dois ERFs encontram-se CaPF1, um ERF capaz de conferir tolerância a *Pseudomonas syringae* e congelamento em *Arabidopsis* e SIJERF3, uma proteína responsiva a etileno e jasmonato, capaz de induzir tolerância a patógenos, salinidade, seca e congelamento.

ScERF1 formou um clado junto aos seus prováveis representantes de arroz (Os03g08470), sorgo (Sb147545) e cevada (HvRAV). Este último capaz de induzir em *Arabidopsis* resistência a sal e *R. solanacearum*, uma bactéria patogênica do solo (Jung e cols., 2007).

ScERF7 formou um clado separado, com seus prováveis ortólogos de arroz (Os09g26420) e sorgo (Sb4874673), mas de função ainda desconhecida.

O prováveis ortólogos de ScERF3 em sorgo (Sb02g039300), bem como os de arroz (Os03g08500) e sorgo (Sb4998749) de ScERF2 também foram identificados, mas ainda não existe descrição de suas funções.

4.2 – Verificação da resposta dos ERFs ao etileno, jasmonato e sua combinação

Apesar da semelhança com ERFs nas seqüências de proteínas, para verificar se as proteínas estudadas são de fato responsivas a etileno, plântulas micropropagadas livres de microorganismos foram tratadas com etephon, um composto que libera etileno em meio de cultura e ácido jasmônico, o sinergista do etileno em sinalização de RSI. O padrão de expressão dos ERFs em resposta a esses hormônios foi estudado por PCR em tempo real (Figura 11).

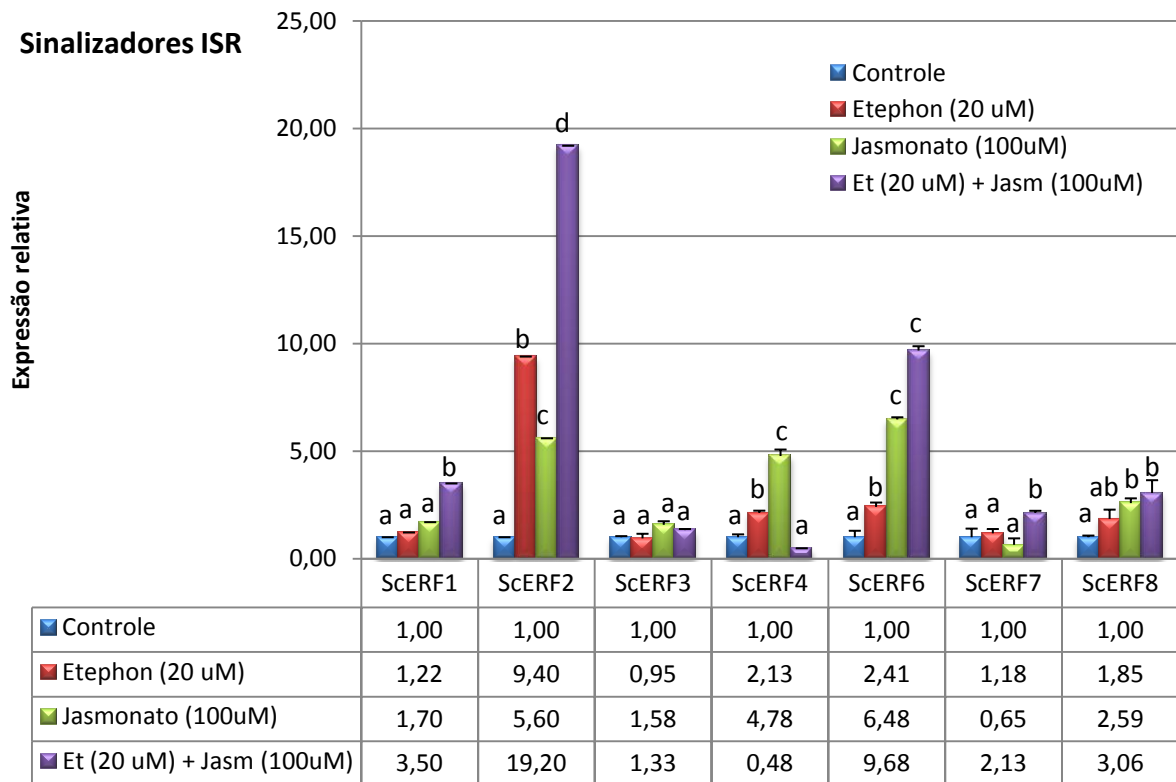


Figura 11 - Análise da expressão relativa dos ERFs em plântulas tratadas com etileno e jasmonato.

Os genes identificados (ScERF1-8) tiveram sua expressão quantificada por PCR em tempo real em plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas *in vitro* tratadas por 10 horas com etephon 20 μ M, ácido jasmônico 100uM e ambos. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as barras de erro indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tuckey.

Como descrito por Cavalcante, e cols. (2007), ScERF1 não possui uma resposta significativa à adição de etileno, ou jasmonato separados. O gene é significativamente induzido, no entanto com a adição de ambos. Já ScERF2 tem sua expressão aumentada 9 vezes com a adição de etileno, cinco vezes com a adição de jasmonato e dezenove vezes com ambos. ScERF3 e ScERF7 não mostraram resposta significativa à aplicação dos hormônios separadamente, apesar de ScERF7 responder à sua combinação. ScERF4 é induzido por etileno, tendo sua expressão aumentada em duas vezes e quatro vezes aumentada por jasmonato, curiosamente a adição de ambos não tem o efeito sinérgico observado em todos os outros genes estudados. ScERF6 e ScERF8 seguem o padrão de ScERF1 e ScERF2, sendo induzidos por ambos os hormônios separados, e, em níveis superiores na combinação.

Estes dados confirmam que os ERFs em estudo respondem ao etileno, provavelmente atuando na via de resposta a este hormônio. No entanto, nas condições experimentais testadas, não observamos resposta de ScERF3. Novos experimentos são, então, necessários para confirmar a participação na via de resposta ao etileno.

4.3 – Caracterização da expressão dos ERFs em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas benéficas

Para melhor entender o comportamento destes genes na interação planta - microorganismo, plântulas micropropagadas *in vitro*, livres de microorganismos, foram inoculadas com bactérias endofíticas das espécies *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 e *H. rubrisubalbicans* estirpe M1. Estas bactérias diferem por *H. rubrisubalbicans* ser um potencial patógeno em função do genótipo da planta colonizada, enquanto *G. diazotrophicus* é descrito como não patogênica em todas as situações estudadas até o

momento. A expressão gênica dos ERFs foi avaliada por PCR em tempo real e estão representadas na Figura 12.

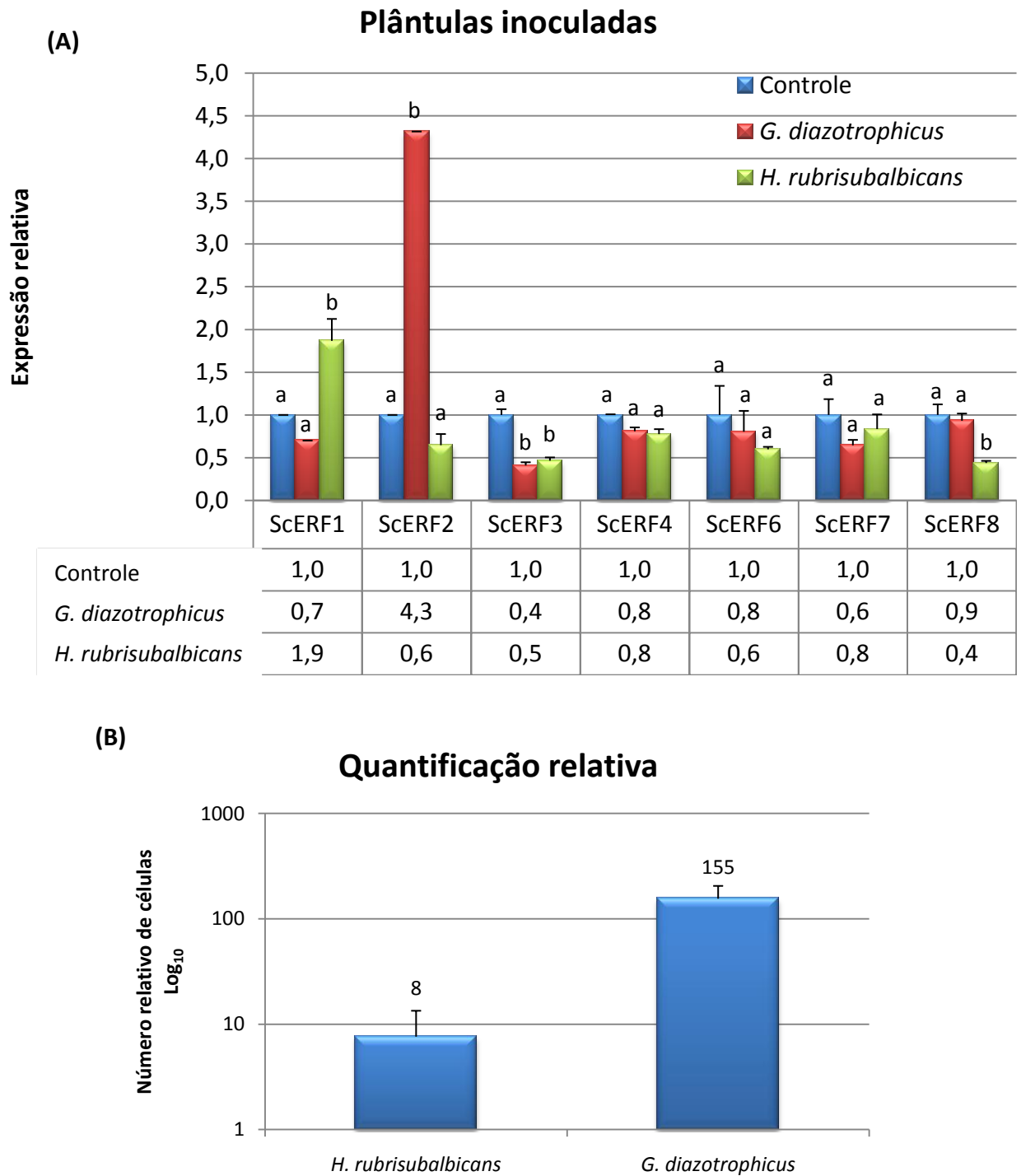


Figura 12 - Análise da expressão dos ERFs em resposta à inoculação com endofíticos. (A) A expressão dos genes identificados (ScERF1-8) medida por PCR em tempo real em plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas *in vitro* inoculadas por 7 dias com 150 µL de meio de cultura contendo as bactérias *G. diazotrophicus* (PAL5) e *H. rubrisubalbicans* (M1) DO₆₀₀=0,6. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as barras de erro indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tuckey. **(B)** A quantidade relativa, avaliada por PCR em tempo real, da quantidade de bactérias nos tecidos das plântulas representada pelos níveis de RNAr 23S de cada espécie normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno.

Nas condições experimentais testadas, foi observado que ScERF1, ScERF2, ScERF3 e ScERF8 respondem diferencialmente à inoculação com os endofíticos. ScERF1 é induzido por *H. rubrisubalbicans*, enquanto ScERF2 tem a resposta contrária, sendo induzido por *G. diazotrophicus*. ScERF3 é inibido por ambas as bactérias, e ScERF8 inibido apenas por *H. rubrisubalbicans*. Os outros genes não foram significativamente regulados pela inoculação com endofíticos.

Os dados indicam que a expressão dessas ERFs, e consequentemente a via de resposta ao etileno, pode responder diferencialmente a diferentes genótipos de bactérias endofíticas benéficas.

4.4 – Comparação da regulação dos ERFs em plantas inoculadas com as bactérias benéficas e patogênicas

Uma vez que quatro dos ERFs estudados responderam diferencialmente entre o endofítico benéfico e o potencialmente patogênico e já foi observado o papel de seus ortólogos em outras plantas na promoção da resistência a patógenos, a resposta à inoculação com um patógeno foi verificada através da inoculação de *Xanthomonas albilineans*, o agente causador da estria foliar.

Os resultados das análises por PCR em tempo real são representados na Figura 13.

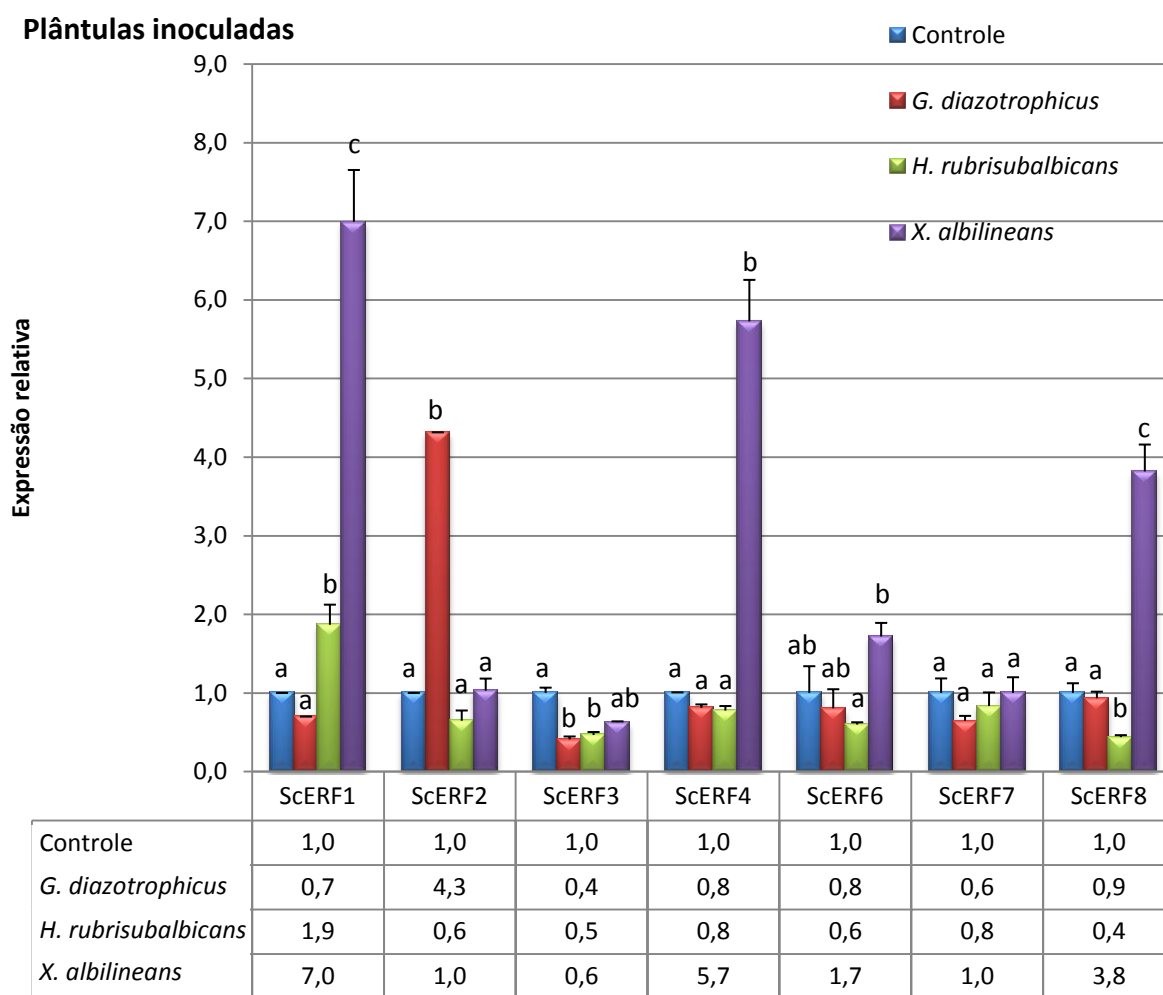


Figura 13 - Análise da expressão dos ERFs após inoculação com patógeno. A expressão dos genes identificados (ScERF1-8) foi medida por PCR em tempo real em plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas in vitro inoculadas por 7 dias com 150 µL de meio de cultura contendo as bactérias endofíticas *G. diazotrophicus* (PAL5) e *H. rubrisubalbicans* (M1) e a patogênica *X. albilineans* serobar1 DO₆₀₀=0,6. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as barras de erro indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tuckey.

A expressão dos genes avaliada por PCR em tempo real indicam que ScERF1, ScERF2, ScERF4 e ScERF8 responderam diferencialmente à inoculação com a bactéria patogênica em relação à benéfica. ScERF1, ScERF2 e ScERF8 foram fortemente induzidos (sete, cinco e três vezes respectivamente) pela inoculação com *X. albilineans* enquanto ScERF2 não sofreu regulação, diferentemente do ocorrido pela inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Os dados indicam que a via de resposta do etileno tem um padrão de expressão que diferencia a resposta às bactérias benéficas e patogênicas. Ou seja, as respostas são específicas para cada tipo de bactéria. ScERF1 tem um padrão de expressão interessante. Ele não responde ou é levemente reprimido na presença da bactéria não patogênica *G. diazotrophicus*. No entanto, ele é duas vezes induzido pela bactéria benéfica com genes de patogênese, *H. rubrisubalbicans*, e é fortemente induzido (sete vezes) pela bactéria patogênica *X. albilineans*. Esse dado pode sugerir que a via de resposta ao etileno é capaz, de alguma forma, identificar “potenciais patógenos” dentre as bactérias benéficas.

4.5 – Regulação da expressão por inoculação com mutantes não patogênicos de *H. rubrisubalbicans*

Como foi observada uma regulação diferencial da expressão de alguns ERFs por *G. diazotrophicus* (não patogênica), *H. rubrisubalbicans* (potencialmente patogênica) e *X. albilineans* (patogênica), foram usadas cepas não patogênicas do endofítico *H. rubrisubalbicans* para avaliar o efeito da ausência da patogenicidade na regulação dos ERFs estudados. Os mutantes usados neste estudo são nos genes responsáveis pela formação do Sistema de Secreção do Tipo III (Schmidt, 2009) geradas na UFPR e gentilmente cedidas pelo Dr. Emanuel Souza. Plântulas micropropagadas *in vitro* foram inoculadas com as cepas M1

(selvagem), TSN (mutante para o gene *hrcN*) e TSE (mutante para o gene *hrpE*) ou com meio estéril. Antes de congeladas, as plantas foram lavadas repetidamente com água destilada. A contagem do número relativo de bactérias nos tecidos das plantas foi feita pela amplificação por PCR em tempo real do RNAr 23S de *H. rubrisubalbicans* Figura 14.

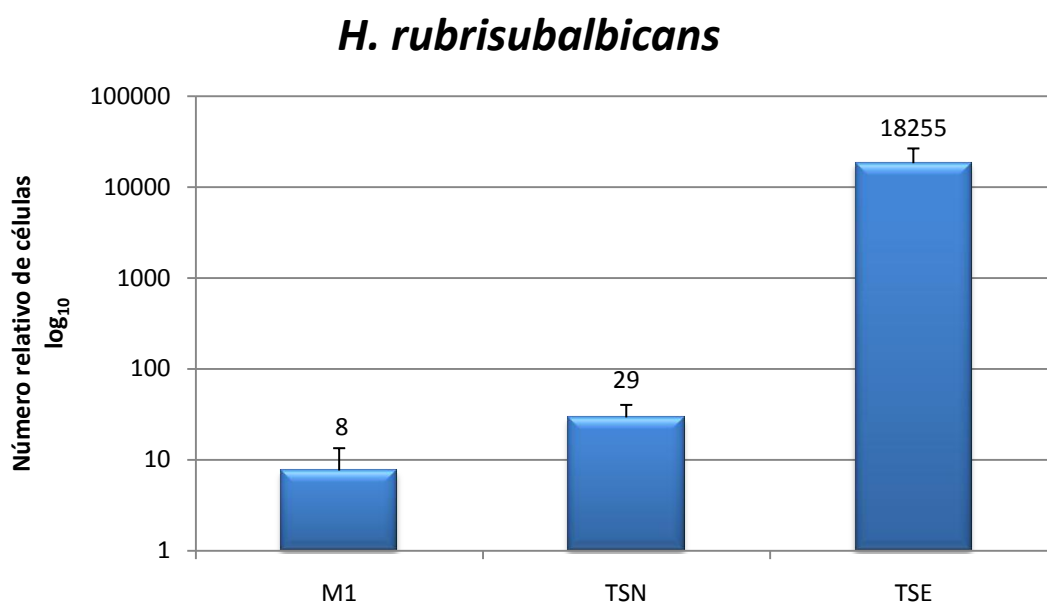


Figura 14 - Quantificação relativa da população das cepas de *H. rubrisubalbicans* colonizando plântulas de cana-de-açúcar. A quantidade relativa, avaliada por PCR em tempo real, de bactérias nos tecidos de plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas *in vitro* foram inoculadas com 150 μ l $DO_{600}=0,6$ da cepa selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e das cepas deficientes nos genes responsáveis pela expressão das proteínas do SST3 *hrcN*, TSN e *hrpE*, TSE. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAr 23S normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta Ct}$ e as barras de erro indicam o erro padrão.

Como pode ser visto na Figura 14, os mutantes de *H. rubrisubalbicans* defeituosos no Sistema de Secreção do Tipo III, colonizaram a planta em números superiores à cepa selvagem. A população de TSN apresentou mais de três vezes maior e a de TSE mais de duas mil vezes.

A expressão dos genes ERF em resposta aos mutantes de *H. rubrisubalbicans* foi avaliada por PCR em tempo real (Figura 15). Apesar da grande diferença no número de bactérias na planta, a regulação dos ERFs pela inoculação com estes mutantes não foi diferencial para a maioria dos genes cepas, sugerindo que ela é mais dependente da espécie do que do tamanho da população de bactérias na planta. Os dados também sugerem que o Sistema de Secreção do Tipo III aparentemente não está envolvido no mecanismo de regulação da via de resposta ao etileno em genótipo de cana-de-açúcar no qual este sistema não leva à patogênese (SP70-1143). Apenas um dos genes estudados, o ScERF8, sofreu regulação diferencial entre as cepas utilizadas. Sua expressão foi duas vezes maior no mutante não patogênico TSE em relação à cepa selvagem.

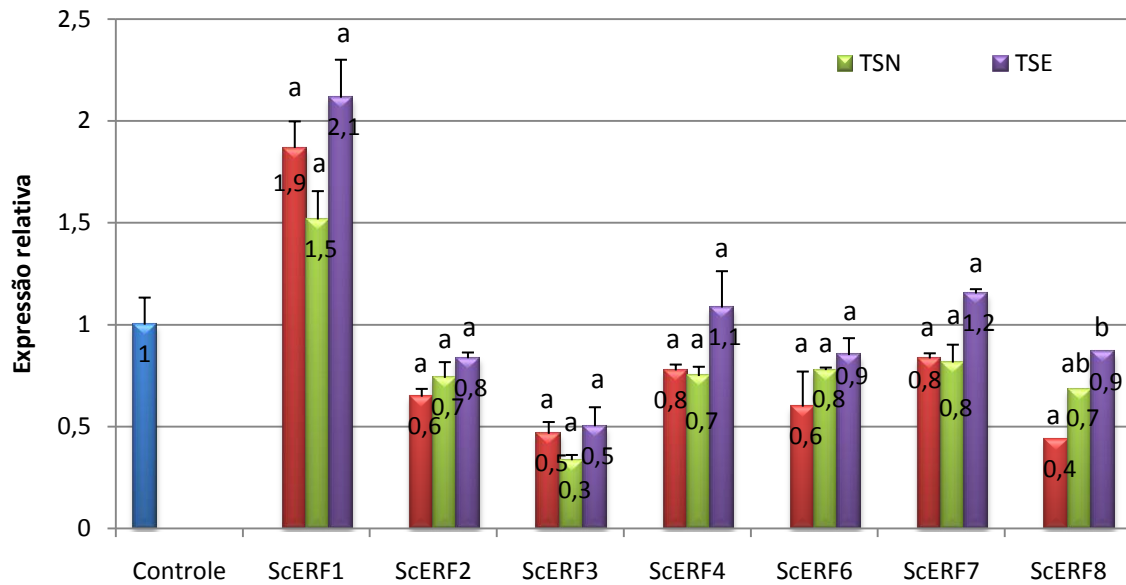


Figura 15 - Análise da expressão dos ERFs em função da inoculação com *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes. Expressão dos genes identificados (ScERF1-8) medida por PCR em tempo real em plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas *in vitro* e inoculadas com 150 µl D.O.=0,6 da cepa selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e das cepas deficientes nos genes responsáveis pela expressão das proteínas do SST3 *hrcN*, TSN e *hrpE*, TSE. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e as barras de erro indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tuckey.

4.6 – Estudo da regulação da expressão gênica dos ERFs durante a promoção da defesa por *G. diazotrophicus* contra *X. albilineans*

A promoção da defesa contra patógenos por bactérias da rizosfera já foi descrita em vários sistemas biológicos (Van Loon e cols., 1998; Knoester e cols., 1999; Vallad e cols., 2004). O trabalho responsável por identificar três dos ERFs investigados neste estudo realizado por (Arencibia e cols., 2006), já demonstrara evidências de que bactérias endofíticas de gramíneas também podem promover este tipo de resistência. Uma vez que o subgrupo ao qual seis dos ERFs em estudo pertencem está envolvida com resistência a patógenos e os genes mostraram-se responsivos aos principais sinalizadores de RSI, foi montado um novo ensaio de inoculação, desta vez com intuito de analisar separadamente material de raiz e parte aérea, que é descrito na seção Materiais e Métodos e os resultados apresentados a seguir.

4.6.1 – Desenvolvimento de um novo sistema de inoculação com as bactérias endofíticas

O método de inoculação de plântulas micropropagadas *in vitro* até então utilizado pelo grupo no qual este trabalho se insere permite a inoculação de plântulas livres de microorganismos, garantindo que a resposta analisada resulte da presença da bactéria inoculada. Este tipo de ensaio, no entanto possui algumas limitações, uma vez que as raízes formadas em cultura de tecido, necessárias para a penetração da bactéria, não são funcionais como em solo e possuem uma massa muito baixa para a extração de RNA. Por esse motivo, o RNA é extraído da plântula inteira.

Para realizar um estudo mais preciso da regulação gênica promovida pela inoculação de bactérias em plantas livres de microorganismos, é de grande valia a obtenção de amostras de tecido individualizados, especialmente da raiz que funciona como ponto de entrada dos endofíticos e, portanto o primeiro tecido a realizar algum tipo de sinalização.

Para alcançar estes objetivos, foi desenvolvido um sistema no qual a plântula é multiplicada *in vitro*, para garantir a ausência de microorganismos, tratada com hormônios para a formação de primórdios de raiz ainda em cultura de tecido e então transferida para um meio hidropônico, em casa de vegetação, com fotoperíodo e temperatura controlados.

Para tal, duas composições de nutrientes em três concentrações foram testadas: meio MS 1× (Materiais e Métodos), MS 0,5× e MS 0,25×, solução Hoagland 1× (Materiais e Métodos), 0,5× e 0,25×. Características como cor das folhas (indicação indireta de conteúdo de clorofila), quantidade de raízes e rigidez das folhas foram avaliadas na busca pela condição de menor estresse para a planta.

O meio hidropônico foi acondicionado em calhas, e as plantas ficam suspensas sobre telas, pela qual emitem raízes. Na primeira semana elas foram aclimatadas, com uma cobertura plástica sobre a parte aérea que mantém a umidade alta. Neste tempo uma grande massa de raízes também é formada.

A solução Hoagland 0,5× resultou nas plantas de cor verde mais intenso, maior volume de raízes e folhas mais rígidas (Figura 16) sendo, portanto escolhido para os ensaios de inoculação.

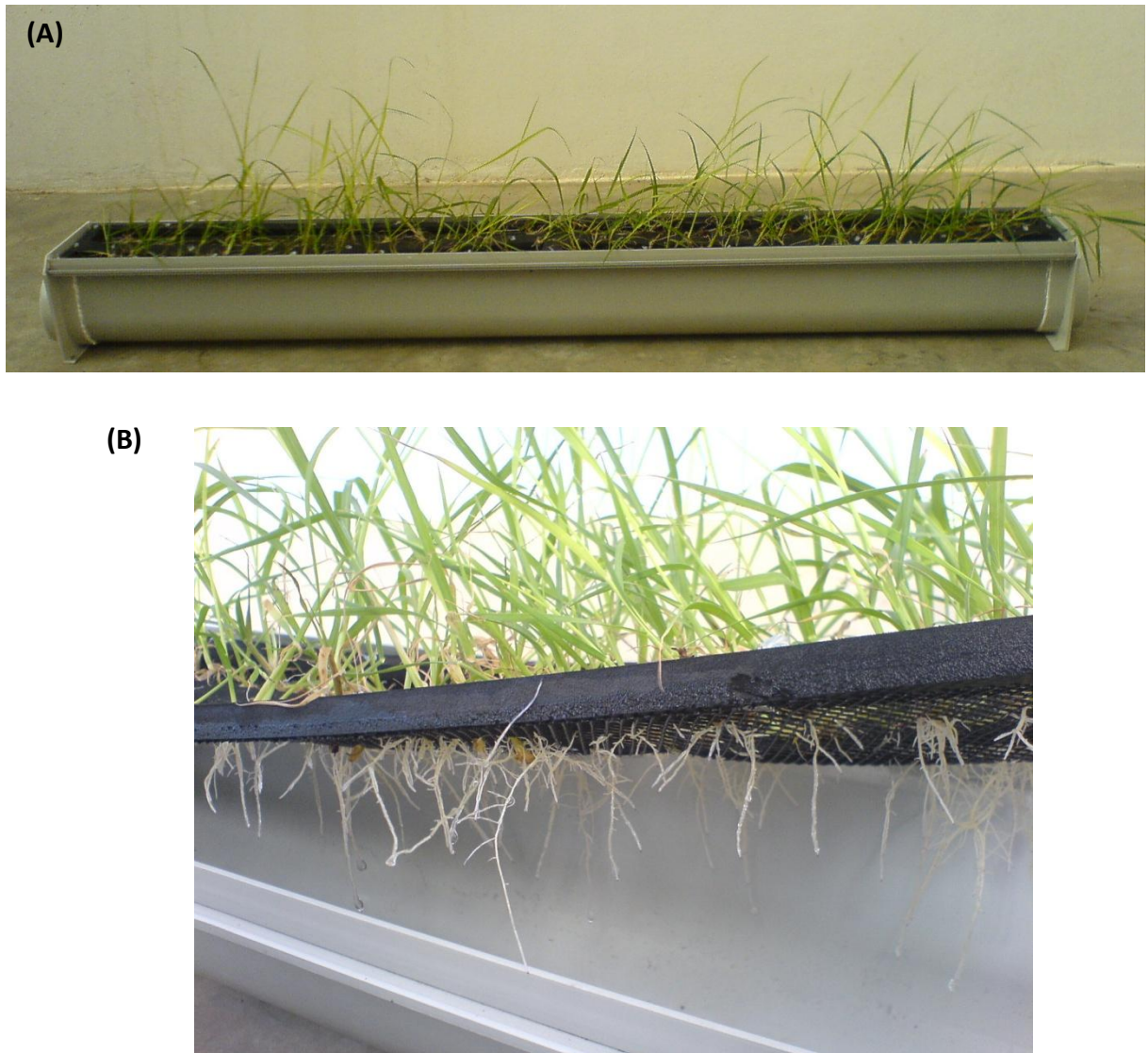
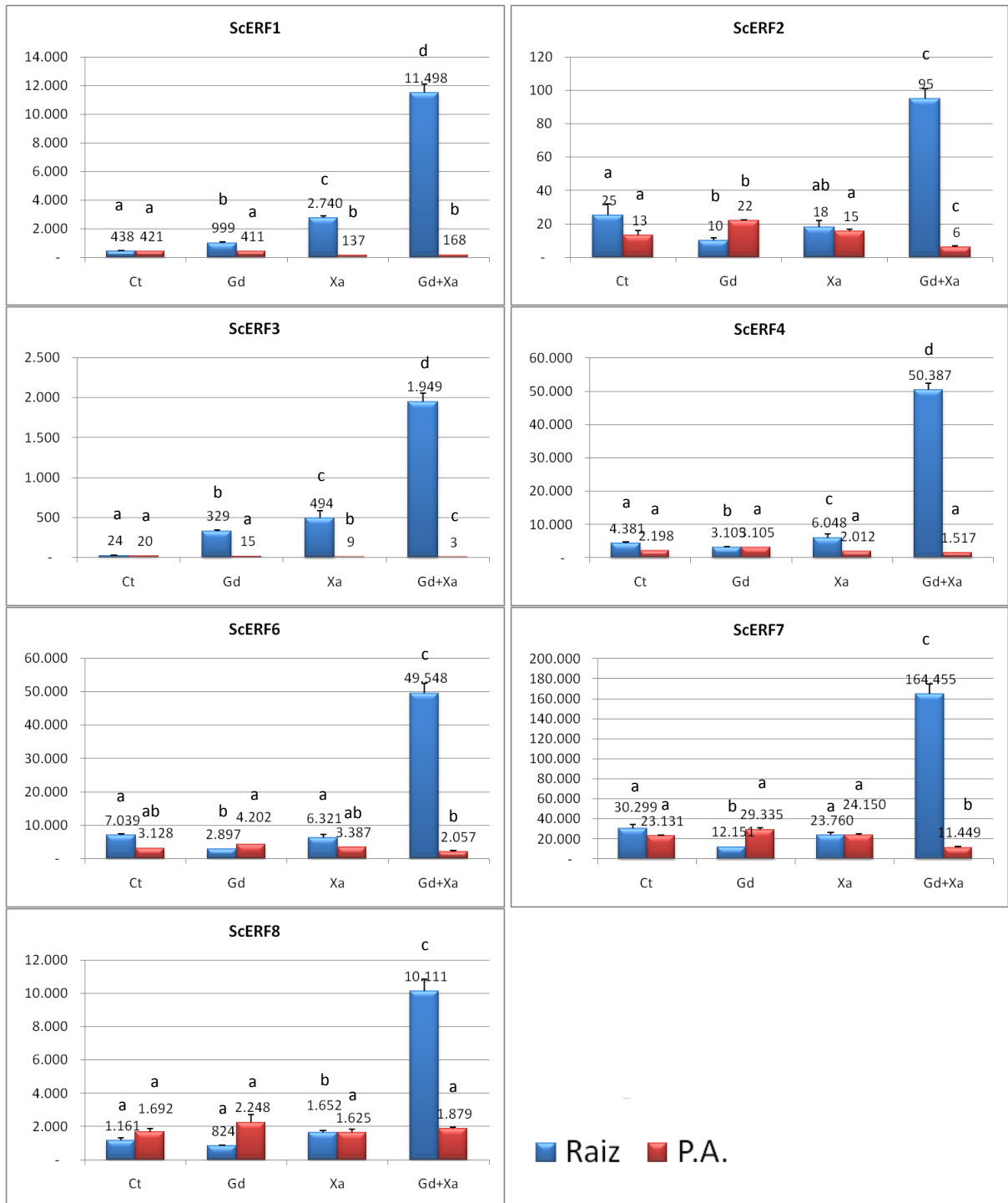


Figura 16 – Resultado do enraizamento em meio hidropônico. (A) Aclimação e enraizamento de plântulas micropropagadas *in vitro* em meio hidropônico (meio Hoagland 0,5×) fotoperíodo 12/12 a 28°C. (B) Formação de raízes funcionais em grande volume no meio hidropônico.

4.6.2 – Estudo da regulação da expressão gênica dos ERFs

Plântulas micropropagadas *in vitro*, aclimatadas e enraizadas, em cultura hidropônica foram inoculadas com o endofítico *G. diazotrophicus* e posteriormente com o patógeno *X. albilineans*. Os tecidos foram separados e a expressão relativa dos ERFs analisada por PCR em tempo real (Figura 17).



O sistema radicular mostrou ser o tecido preferencial de modulação da expressão desses genes na inoculação do endofítico (*G. diazotrophicus*). ScERF1 e ScERF3 foram induzidas, enquanto ScERF2, ScERF6 e ScERF7 foram inibidas neste tecido. Nenhum gene foi significativamente regulada pela inoculação do endofítico na parte aérea.

Os dados são marcantes em mostrar que, apesar de alguns ERFs serem induzidos em plantas inoculadas somente com *G. diazotrophicus* (ScERF1 e ScERF3) e outras serem induzidas apenas em plantas infectadas com *X. albilineans* (ScERF2) todos os ERFs foram fortemente induzidos em raízes de plantas previamente inoculadas com *G. diazotrophicus* e posteriormente inoculadas com *X. albilineans*.

4.7 – Avaliação da resposta da expressão gênica dos ERFs ao estresse osmótico

Uma vez que estudos funcionais com representantes dos ERFs da subfamília VII, além revelarem a indução da resistência a patógenos, também descreveram aumento da tolerância à seca e/ou estresse hídrico (Wang e cols., 2004; Jung e cols., 2007; Wu e cols., 2008; Zhang e cols., 2010) a resposta dos ERFs de cana-de-açúcar para o estresse osmótico também foi avaliada. O estresse osmótico foi induzido em plântulas micropropagadas nas mesmas condições de crescimento usadas nos experimentos de inoculação. Após o enraizamento as plântulas foram transferidas para meio MS 0,1× contendo 500 mM de D-mannitol. A Figura 18 mostra o padrão de expressão dos ERFs analisados por PCR em tempo real.

Estresse osmótico

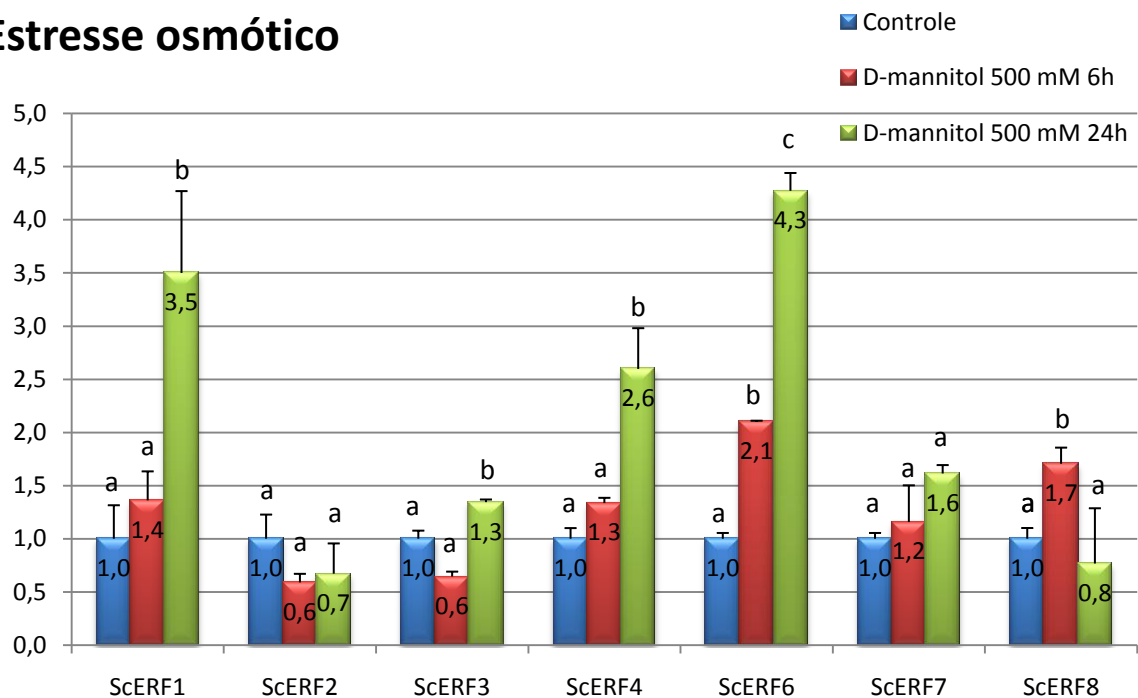


Figura 18 – Análise da expressão dos ERFs em resposta a estresse osmótico. Expressão dos genes identificados (ScERF1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8) medida por PCR em tempo real em plântulas do cultivar SP70-1143 micropropagadas *in vitro* e transferidas para meio MS 0,1× contendo 500 mM de D-mannitol. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e as barras de erro indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tuckey.

ScERF1, ScERF4 e ScERF6 responderam significativamente ao tratamento com D-mannitol. Estes são os mesmos genes mais próximos na árvore filogenética da subfamília VII, e também com maior homologia em relação aos genes de função descrita: CaPF1, OsEREBP1, SIJERF3 e HvRAV. É interessante notar também, que estes foram os genes da subfamília VII mais responsivos à inoculação com o patógeno, o que pode sugerir que participem de vias de resposta ao etileno que sejam ativadas em resposta a estresses bióticos e abióticos.

4.8 – Caracterização do padrão de expressão de ERFs de cana-de-açúcar durante o desenvolvimento

Em ensaios de inoculação de plântulas livres de microorganismos, os ERFs estudados mostraram-se preferencialmente regulados no sistema radicular. Esta resposta pode tanto estar ligada a uma maior atuação da via de resposta ao etileno nesse órgão em resposta ao endofítico e/ou ao papel do etileno no desenvolvimento vegetal. Em função disto, estudamos também o perfil de expressão dos ERFs no outro modelo de associação: em tecidos de plantas germinadas a partir de toletes. Este modelo permite analisar uma planta que já possui uma população de endofíticos natural, mas está em fase de restabelecimento da interação, uma vez que estão sendo formados novos tecidos e estes sendo colonizados pelos endofíticos.

Para esse estudo, toletes da variedade SP70-1143 foram germinados em potes contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1. Raízes e parte aérea foram coletadas individualizadas 15 dias após o plantio dos toletes. A parte aérea foi também coletada 30 dias após o plantio e folhas maduras de plantas de campo com três anos foram também analisadas nesse estudo. A Figura 19 mostra os resultados.

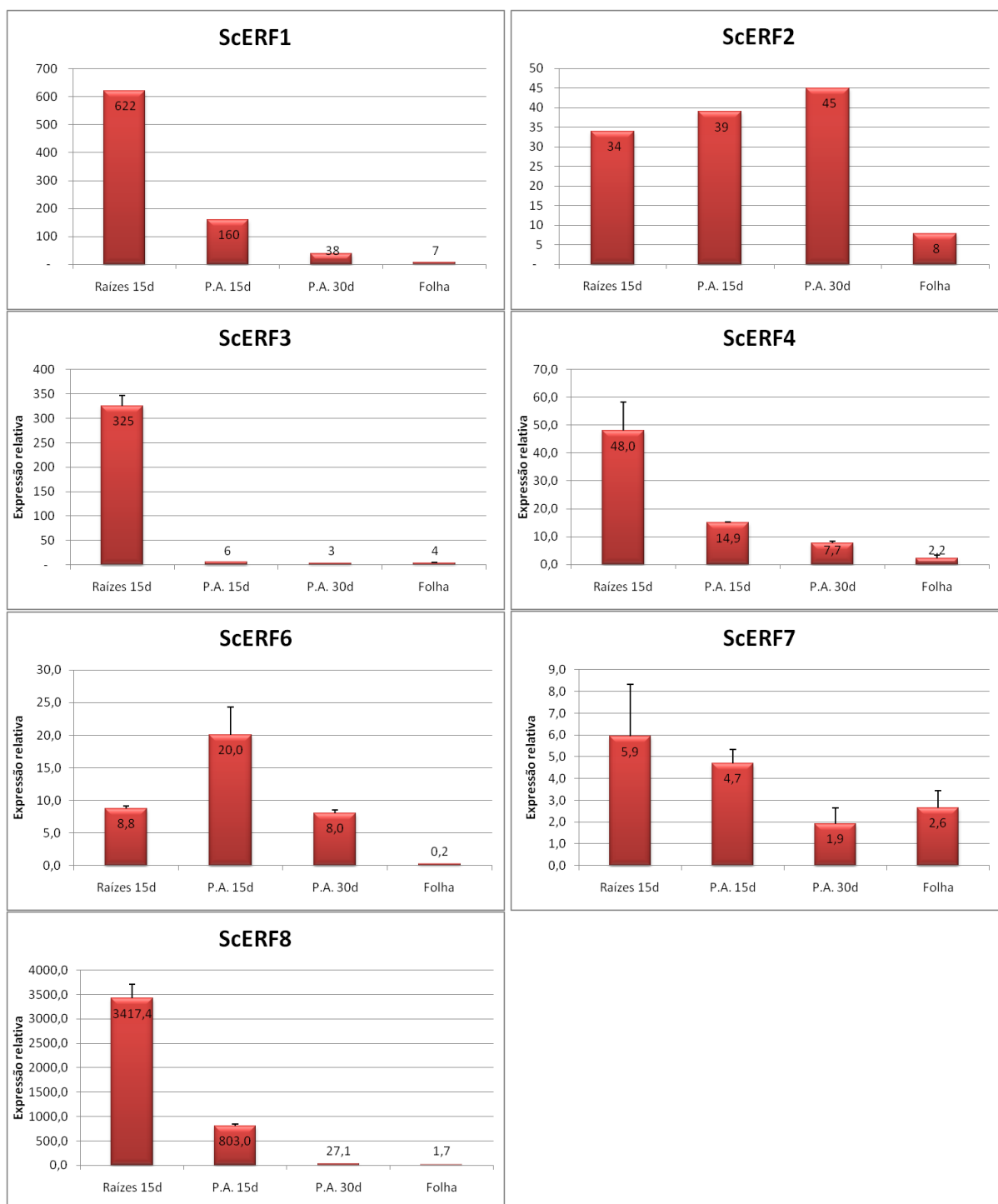


Figura 19 - Análise da expressão dos ERFs em fases do desenvolvimento do genótipo eficiente. Expressão dos genes identificados (ScERF1-8) medida por PCR em tempo real em diferentes tecidos de plantas do cultivar SP70-1143 germinadas a partir de toletes em potes contendo uma mistura de areia e vermiculita 2:1. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno. Barras indicam médias calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as barras de erro indicam o erro padrão.

O perfil de expressão gênica dos ERFs, avaliado por PCR em tempo real revela que ScERF1, ScERF3, ScERF4, e ScERF8 foram mais expressos em raízes do que em qualquer tecido aéreo coletado. ScERF7 não apresentou expressão significativamente maior em raiz no tempo de 15 dias, apenas em comparação à parte aérea de 30 dias ou à folha. ScERF6 foi mais expressa em parte aérea da plantas com 15 dias e ScERF2 mostrou expressão diferencial apenas em folhas, sendo três a quatro vezes menor neste tecido que nos demais.

Existe uma regulação diferencial dos ERFs ao longo do desenvolvimento dos toletes germinados, que pode refletir o estabelecimento da interação, similar à inoculação de plântulas livres de microorganismo, como visto no experimento

4.9 – Expressão diferencial entre genótipos contrastantes

SP70-1143 é um cultivar que apresenta taxas altas de FBN e, portanto utilizado como modelo de uma associação eficiente. Para avaliar a possibilidade da utilização desses genes como marcadores de uma interação eficiente, a expressão destes genes foi medida em toletes de Chuneé (*S. barberi*), um dos genótipos com as menores taxas de FBN conhecidas e comparada com o cultivar SP70-1143 Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação da expressão dos ERFs entre tecidos dos cultivares eficiente e ineficiente na associação. A expressão dos genes identificados (ScERF1-8) foi medida por PCR em tempo real em diferentes tecidos de plantas dos genótipos contrastantes: eficiente (SP70-1143) e ineficiente (Chunee) germinadas a partir de toletes em potes contendo uma mistura de areia e vermiculita 2:1. Cada ponto individual da amostra representa a média dos valores das triplicatas técnicas de um grupo de 3 plantas. A tabela representa os níveis de RNAm normalizados pelos níveis de RNAr 28S de cana-de-açúcar, que foi utilizado como controle interno.

Expressão relativa SP70-1143/Chunee

	Raiz 15d	P.A. 15d	P.A. 30d	Folha
ScERF1	0,38	0,98	0,48	7,30
ScERF2	28,33	13,00	45,00	1,95
ScERF3	0,72	0,84	0,35	1,07
ScERF4	9,75	5,15	1,55	0,64
ScERF6	2,99	0,93	1,10	0,18
ScERF7	4,26	1,18	0,72	2,18
ScERF8	2,78	1,00	0,90	0,09

Conforme mostrado na Tabela 1, ScERF2, ScERF4, ScERF6, ScERF7 e ScERF8 são mais expressas em raízes de SP70-1143. Apenas ScERF1 é significativamente menos expressa nas raízes do genótipo eficiente. Na parte aérea de plantas com 30 dias ScERF2 e ScERF4 são mais expressas em SP70-1143. ScERF2 também é mais expressa em SP70-1143 em parte aere de plantas com 15 dias. Neste tecido ScERF1 e ScERF3 tem expressão maior em Chunee, enquanto os outros genes não são regulados. Nas folhas ScERF1, ScERF2 e ScERF7 são mais expressos no genótipo eficiente, ScERF6 e ScERF8 no ineficiente, enquanto ScERF3 e ScERF4 não são significativamente regulados.

Uma vez que ScERF4 e ScERF8 são mais expressos em raízes do genótipo de associação eficiente, tecido este que parece ser o mais importante para a via de resposta do etileno na associação, além de ao mesmo tempo terem expressão preferencial em raízes no início do desenvolvimento, fase de estabelecimento da interação cana-de-açúcar – bactérias

endofíticas, estes dois genes parecem portanto ser os melhores marcadores para um bom potencial de associação durante o melhoramento.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Filogenia e possíveis funções dos ERFs de cana-de-açúcar

A análise das seqüências de aminoácidos previstas a partir dos ESTs seqüenciados pelo projeto SUCEST permitiu identificar nestas seqüências regiões conservadas nas proteínas do subgrupo VII da família ERF, classificadas segundo Nakano e colaboradores (2006). Estas regiões, chamadas motivos, presentes nas seqüências previstas de aminoácidos dos ERFs de cana-de-açúcar confirmam a identidade filogenética com as proteínas já descritas de *Arabidopsis* e arroz. Esta identidade sugere origens evolutivas semelhantes. Como pode ser visto na árvore filogenética da Figura 10, cada ERF de cana formou um clado com uma proteína de arroz e/ou uma de sorgo. Este resultado coincide com a divergência evolutiva destas espécies, sendo a divergência entre cana e sorgo mais recente que entre estas e arroz (Asnaghi e cols., 1999; Grivet e cols., 2001). Desta forma, foram identificados os possíveis ortólogos dos ERFs analisados neste trabalho nestas duas outras espécies que também são colonizadas por bactérias endofíticas (Zinniel e cols., 2002; Rout e cols., 2009).

É marcante observar que das sete ERFs de cana, selecionadas em nosso estudo como potencialmente envolvidas na associação entre cana e bactérias diazotróficas endofíticas, seis foram classificadas como do subgrupo VII. Esses dados sugerem fortemente que esse subgrupo deva ter uma função na associação com os endofíticos. A presença de motivos da subfamília VII nos genes estudados de cana-de-açúcar reforça suas possíveis funções biológicas de reguladores positivos de expressão gênica (Fujimoto e cols., 2000; Sakuma e cols., 2002; Nakano e cols., 2006).

Em sua revisão sobre a família ERF, Nakano e colaboradores (2006), identificaram dois infragrupos no subgrupo VIII, um com os motivos conservado CMVIII-1 e CMVIII-2 e

outro com apenas um motivos conservado chamado de CMVIII-3, chamados respectivamente de subgrupo VIIa e VIIb. A presença dos motivos CMVIII-1/EAR, característico de repressores transcricionais de genes GCC-box, e CMVIII-2 em ScERF8 no único gene classificado fora da subfamília VII, coloca essa proteína dentro do infragrupo VIIa. Em *Arabidopsis*, alguns ERFs deste infragrupo, como AtERF4 e AtERF7 mostraram-se inibidores de genes responsivos a etileno, jasmonato e ABA (Song e cols., 2005; Yang e cols., 2005; McGrath e cols., 2005). A resposta de ScERF8 a etileno, jasmonato e estresse osmótico (sinalizado por ABA) sugere que ele também possa estar envolvido na resposta a esses hormônios em cana-de-açúcar. Neste trabalho ScERF8 mostrou-se responsivo a inoculação com *H. rubrisubalbicans* e *X. albilineans* e foi o único gene regulado diferencialmente pelos mutantes de *H. rubrisubalbicans* com maior população nos tecidos da planta. Por ser um provável repressor transcricional, é possível que ScERF8 funcione numa via paralela de compensação da ativação da via de resposta ao etileno(nesse caso, reprimindo expressão de genes responsivos a etileno). O perfil de resposta de ScERF8 foi semelhante aos de ScERF1, 4 e 6 nas inoculações com endofíticos ou patogênicos, mas não foi claramente induzido por estresse osmótico. Uma hipótese seria que ScERF8 poderia participar de um mecanismo que permitiria a sinalização desencadeada por ScERF1, 4 e 6 sob estresse abiótico, mas inibiria a sinalização sob estresse biótico. Estudos funcionais mais detalhados ainda são necessários, no entanto, para esclarecer este papel. Como já foram descritas interações entre os ERFs AtRAP2.3 e OsEBP89 (ambos subgrupo VII) e outros fatores de transcrição dos tipos bZIP e MYC respectivamente, outras formas de regulação também são possíveis (Büttner e cols., 1997; Zhu e cols., 2003).

Para serem classificados como fatores responsivos a etileno, a regulação da expressão destes genes precisa ser modulada por este hormônio. A indução da expressão

dos ERFs de cana-de-açúcar por etileno (Figura 11) confirma a participação desses genes em sua via de sinalização. A via molecular de resposta ao etileno apresenta interação com outras vias de sinalização, como as vias de resposta a auxina, ácido salicílico e ABA e jasmonato (Sharp e cols., 2002; Anderson e cols., 2004; Ding e cols., 2008; Chung e cols., 2008; Ruzicka e cols., 2007; Pieterse e cols., 2004; Stepanova e cols., 2009), formando uma rede complexa e ainda pouco conhecida. Nesse trabalho, foi observado que os genes ERF também se mostraram responsivos a jasmonato, um elicitador juntamente com o etileno, de RSI (Stepanova e cols., 2009).

Cinco receptores de etileno são conhecidos em *Arabidopsis* e arroz (Etheridge e cols., 2005; Stepanova e cols., 2009), não se sabe, porém ainda se todos os receptores estão envolvidos com a mesma via de resposta ao etileno. Além disso, os membros da via de resposta que se segue aos receptores são também codificados por famílias gênicas, culminando ao final com um grande número de ERFs regulando a expressão de genes responsivos ao etileno. Ou seja, além dos receptores de etileno poderem responder a estímulos distintos, acreditamos que exista um leque de possibilidades de caminhos que a via de resposta de etileno pode seguir, provavelmente levando a respostas específicas na planta.

5.2 – Regulação gênica dos ERFs em resposta a inoculação com endofíticos

A regulação dos ERFs no estabelecimento da interação com endofíticos pode ser vista em dois modelos distintos: na inoculação em plântulas livres de bactérias (Figura 17) e na germinação de toletes que já carregam uma população de endofíticos, e necessita estabelecer uma nova interação na plântula que germina (Figura 19). Comparando estes dois casos, pode ser observado que ocorre uma expressão preferencial de ScERF1, ScERF4 e

especialmente ScERF3 nas raízes, em relação ao controle que tem níveis de expressão entre os tecidos semelhantes. ScERF3 também tem sua expressão inibida na inoculação *in vitro* (Figura 12), modelo que analisa preferencialmente tecido aéreo. Algumas vias de defesa de plantas estão ligadas ao desenvolvimento (Chung e cols., 2008), como um dos efeitos observados em plantas inoculadas é o aumento do número de raízes (Olivares e cols., 2002), é possível que ScERF3 esteja envolvida nesta comunicação. Estudos funcionais ainda são necessários para verificar, se ScERF3 realmente possui um papel no desenvolvimento das raízes.

Os genes estudados não parecem responder ao tamanho da população bacteriana dentro da planta (Figura 14 e Figura 15). Este fato sugere que o papel dos ERFs na interação entre cana-de-açúcar e endofíticos diazotróficos talvez não seja de controle populacional, como observado em *M. truncaluta* (Iniguez e cols., 2005), mas possivelmente uma sensibilização causada pela presença da bactéria nos tecidos da planta.

Um outro modelo de estudo foi a análise de um possível efeito de RSI conferido pela inoculação prévia por *G. diazotrophicus*, em plantas posteriormente infectadas por um patógeno (*X. albilineans*). A resposta do tipo RSI descrita para a associação de plantas com RPCV não implica em mudanças fisiológicas claras nas plantas, ao invés disso ocorre uma sensibilização que torna as vias de sinalização mediadas por etileno e jasmonato da planta muito mais responsivas à posterior inoculação de um patógeno (Verhagen e cols., 2004; Van der Ent e cols., 2009). Um efeito muito semelhante foi observado em cana-de-açúcar previamente inoculada com o endofítico dizotrófico *G. diazotrophicus*: os ERFs analisados neste estudo responderam muito pouco à inoculação com o endofíticos, mas a resposta do

grupo previamente inoculado com o endofítico benéfico à inoculação com o patógeno foi várias vezes mais intensa (Figura 17).

Resta saber, no entanto que moléculas do microorganismo são reconhecidas pela cana-de-açúcar. Na interação com RPCV, moléculas como lipopolissacarídeos (LPS), flagelina, sideróforos quelantes de Fe^{+3} , antibióticos, biosurfactantes são chamadas de MAMP (“Microbe Associated Molecular Pattern”), e reconhecidas por receptores específicos daquele padrão, de forma muito semelhante aos de microorganismos patogênicos. O reconhecimento pelos receptores é capaz de ativar RSI, levando a planta a um estado sensibilizado (Kloepper e cols., 2004; Jones e cols., 2006; Bakker e cols., 2007; Van Wees e cols., 2008; Schwessinger e cols., 2008). A resposta de RSI para diazotróficos endofíticos já foi descrita na associação entre arroz e *Azoarcus* (Miché e cols., 2006). Por isso é interessante saber se os mutantes de *H. rubrisubalbicans*, sem o SST3 são capazes de elicitar o mesmo tipo de resposta visto com *G. diazotrophicus*.

Dessa forma, no que diz respeito à via de sinalização do etileno, é provável que a interação entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas seja muito semelhante à observada entre RPCV.

5.3 – A interação cana-de-açúcar – bactérias endofíticas e resistência a estresse biótico e abiótico mediada por ERFs

Conforme já discutido acima, a classificação filogenética dos genes estudados agrupou seis, dos sete genes estudados em uma subfamília de ERFs envolvida com resposta a jasmonato, resistência a patógenos e seca (Cheong e cols., 2003; Zhu e cols., 2003; Tang e cols., 2005; Jung e cols., 2007; Wu e cols., 2008; Zhang e cols., 2010) ou congelamento (Yi e cols., 2004; Tang e cols., 2005), um tipo de estresse que causa muitos efeitos fisiológicos

semelhantes ao estresse de seca, como pressão de turgor negativa, aumento da concentração dos solutos celulares e modificação dos potenciais de membrana (Beck e cols., 2007).

O estudo da associação entre plantas e RPCV já mostrou que estas bactérias são capazes de melhorar a absorção de nutrientes do solo e gerar um tipo de resposta conhecida como tolerância sistêmica induzida, tornando as plantas mais resistentes à seca e salinidade do solo (Kim e cols., 2008; Yang e cols., 2009). Assim como a resistência à doença induzida pelo endofítico resulta na sensibilização dos ERFs da subfamília VII de cana-de-açúcar, de maneira muito semelhante ao que ocorre na associação com RPCV, é possível que a resistência à seca induzida por endofíticos envolva o mesmo mecanismo, como ocorre com a tolerância sistêmica induzida por RPCV, tornando a planta mais responsiva à condição de seca. Mais estudos precisam ser feitos, no entanto, pois ainda não é sabido se bactérias endofíticas produzem, em cana-de-açúcar, o mesmo tipo de resistência à seca observada em trigo e milho pela inoculação com *Azospirillum* spp. (Casanovas e cols., 2002; Arzanesh e cols., 2009) apesar deste também ser um endofítico de cana-de-açúcar (Oliveira e cols., 2002; Pedraza, 2008). Caso isto seja confirmado é possível que ABA, etileno e jasmonato atuem sinergicamente na interação cana-de-açúcar-diazotróficos endofíticos, como visto em *Medicago trunculata* (Ding e cols., 2008).

Uma vez que a indução da resistência a patógenos (Arencibia e cols., 2006; Jung e cols., 2007) e à seca (Casanovas e cols., 2002; Arzanesh e cols., 2009) já foram documentadas como benefícios da interação gramíneas - endofíticos e os ERFs, especialmente os da subfamília VII já descritos têm a função de promover estes mesmos efeitos descritos (Cheong e cols., 2003; Wang e cols., 2004; Tang e cols., 2005; Jung e cols.,

2007; Wu e cols., 2008; Zhang e cols., 2010), é possível que os ERFs estudados nesta dissertação participem da promoção da resistência a estresses bióticos e abióticos induzida por bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. O padrão de regulação de ScERF1, ScERF4 e ScERF6 tanto pelo patógeno *X. albilineans* (Figura 13 e Figura 17) quanto pelo estresse osmótico (Figura 18) aliados a sua similaridade filogenética a genes com função descrita na resistência a estresses do tipo biótico e abiótico (Figura 10) sugere que estes três genes sejam os principais candidatos na promoção deste efeito em cana-de-açúcar.

Como já discutido acima, uma das perguntas que devem ser respondidas sobre a interação da planta com as bactérias diazotróficas benéficas é se de fato ocorre a promoção da resistência a estresse hídrico em cana-de-açúcar. Caso isso seja confirmado, seria interessante identificar quais mecanismos estariam envolvidos, e a metodologia de crescimento de plantas livres de microorganismos no sistema hidropônico, estabelecida nesse trabalho, pode ajudar a estudar estes efeitos por permitir análises em tecidos específicos como as raízes, que possivelmente estão mais envolvidas com a interação que os órgãos aéreos (Figura 17, Figura 19 e Tabela 1).

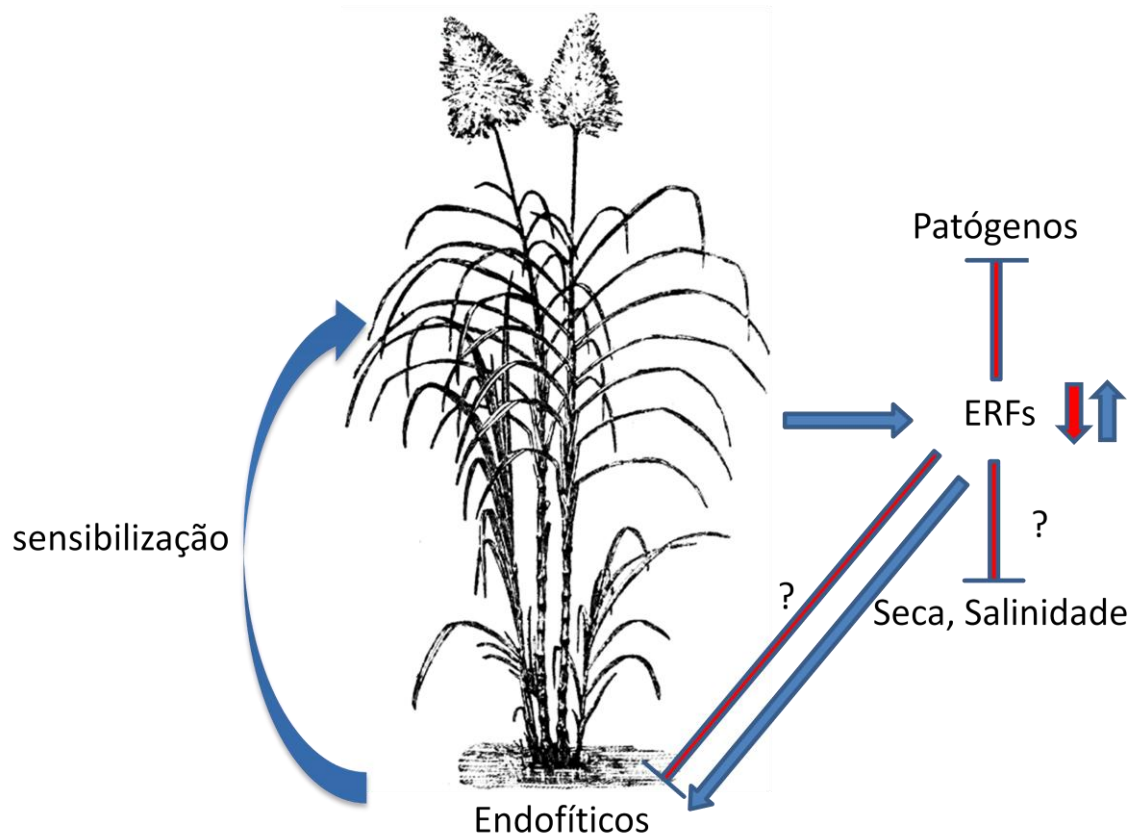


Figura 20 – Modelo hipotético da possível promoção de Resistência Sistêmica Induzida e Tolerância Sistêmica Induzida por endofíticos diazotróficos em cana-de-açúcar mediada por ERFs. As bactérias sensibilizam a planta através de alguma molécula ainda desconhecida, tornando-a mais responsiva aos estresses do tipo biótico e abiótico. No momento do contato com patógenos, os ERFs são fortemente induzidos, promovendo a defesa.

5.4 – ERFs como marcadores de associação eficiente

A expressão dos ERFs selecionados para este trabalho, especialmente em raízes, parece relacionar-se com as situações de maior vigor e resistência a estresse. Como demonstrado no experimento de indução de resistência à patógeno e na comparação da expressão gênica nas raízes de toletes dos genótipos eficiente e ineficientes para a associação, salvo ScERF1 e ScERF3 neste último, a maior expressão destes ERFs com prováveis funções na resistência a estresses bióticos e abióticos está relacionada com as condições de maior vigor da planta.

Estudos funcionais ainda precisam ser feitos para determinar o papel dos ERFs de cana-de-açúcar na interação planta-bactéria. Mas como visto neste trabalho, os ERFs estudados podem servir como marcadores de uma boa associação com endofíticos, provavelmente não do ponto de vista da fixação biológica de nitrogênio, mas pela promoção de defesa e resistência a estresses. SNPs presentes nestes genes podem, por exemplo, ser utilizados como marcadores moleculares de ERFs responsivas a endofíticos (Gupta e cols., 2001; Ayeh, 2008), e é um trabalho já em andamento no laboratório.

As análises de expressão destes genes também são úteis para a identificação de regiões promotoras mais responsivas e específicas à associação com endofíticos, que podem ser úteis na construção de uma planta transgênica com melhor eficiência de interação, visando tecidos específicos para resposta às bactérias.

Finalmente, padrões específicos de expressão dos ERFs, que diferenciem genótipos que estabelecem uma associação eficiente de uma associação ineficiente com as bactérias dizotróficas endofíticas, podem ser usados como marcadores moleculares que auxiliem, por exemplo, programas de melhoramento ou identificação de genótipos mais responsivos à

inoculantes. A família de genes ERFs se mostrou bem interessante para ser usada com esse objetivo, uma vez que: (a) diversas evidências indicam que a via de resposta ao etileno está envolvida em aspectos distintos da associação da planta com as bactérias endofíticas benéficas; (b) identificamos ERFs que apresentam padrões de expressão bem específicos indicando uma associação eficiente com a planta. Nas análises, dois grupos se destacaram por regulações específicas de expressão gênica: ScERF1, ScERF4 e ScERF6 por serem induzidos por estresse osmótico e patógenos; e ScERF8 por ser o mais seletivo em relação a endofíticos (*G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*) e patógenos. Além disso, a comparação de expressão gênica durante o desenvolvimento de toletes colonizados pelos endofíticos, no genótipo SP70-1143 (modelo de associação eficiente) e Chuneé (modelo de associação ineficiente) mostrou expressões bem distintas: ScERF4, ScERF6 e ScERF8 foram os mais específicos em raízes do genótipo de alta eficiência da interação (SP70-1143).

Apesar de estudos funcionais serem necessários para compreendermos melhor o papel dos ERFs na interação cana-de-açúcar - bactérias endofíticas., os dados evidenciados neste trabalho apontam para a sensibilização de uma via de resistência a estresses bióticos e abióticos, mediadas por etileno, disparada pela presença das bactérias nos tecidos da planta. Estudos comparativos com outros modelos de interação planta-bactéria benéficas, como com rhizobium e RPCV, podem revelar se existem estratégias comuns e até origens evolutivas similares dos mecanismos moleculares de interação. No que diz respeito à sinalização do etileno, a interação entre cana e endofíticos apresenta maior similaridade com RPCV do que com outros diazotróficos ou endofíticos, como entre *Medicago truncatula* e *Klebsiella* spp. ou *Salmonella* spp. (Iniguez e cols., 2005; Van der Ent e cols., 2009). Para utilização de inoculantes no campo, com o objetivo de indução de resistência a estresses bióticos e abióticos, parece importante a utilização de cultivares capazes de serem

devidamente sensibilizados pela presença do endofítico. A utilização de marcadores de resposta ao etileno no melhoramento é uma opção para seleção destas plantas, apesar de ainda ser necessário entender melhor como ocorre essa sensibilização e quais as moléculas envolvidas tanto por parte da planta quanto das bactérias para desenhar estratégias mais precisas para a aplicação desta técnica.

6 – CONCLUSÕES

- O subgrupo VII dos ERFs estudados é possivelmente o mais responsivo à associação entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas.
- O único ERF estudado que não pertence ao subgrupo VII é um provável repressor transcricional, que pode estar realizando uma compensação da ativação da sinalização da via de resposta ao etileno.
- A metodologia de enraizamento em meio hidropônico mostrou-se um bom método de estudo da interação cana-endofíticos nas raízes.
- A resposta da via de sinalização do etileno observada na associação de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas endofíticas aliada ao fato das raízes parecem muito mais envolvidas, nesta interação, que a parte aérea sugere que os dois tipos de interação são muito semelhantes, especialmente no que diz respeito à via do etileno.
- Os dados observados indicam que alguns ERFs respondem diferencialmente em função da espécie de endofítico inoculada enquanto outros a patógenos.
- A função dos ERFs responsivos às bactérias diazotróficas endofíticas pode estar ligada à ativação de genes de resistência a estresses bióticos e abióticos.
- Os genes ERFs em estudo se mostraram bem interessantes para serem usados como marcadores moleculares de associação eficiente com bacterias diazotróficas endofíticas, uma vez que identificamos ERFs que apresentam padrões de expressão bem específicos indicando uma associação eficiente com a planta.

7 – BIBLIOGRAFIA

Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., e Kazana, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in arabidopsis. *The Plant Cell*, 16 (2004), 3460-3479.

ANP. 2009. ANP Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biocombustíveis. [Online] 2009. [Citado em: 30 de 07 de 2009.] <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/etanol.asp>.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408 (2000), 796–815.

Arencibia, A.D., Vinagre, F., Estevez, Y., Bernal, A., Perez, J., Cavalcante, J., Santana, I., e Hemerly, A.S. Gluconoacetobacter diazotrophicus elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signaling & Behavior*, 1 (2006), e1-e9.

Arzanesh, M.H., Alikhani, H.A., Khavazi, K., Rahimian, H.A., e Miransri, M. In vitro growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings, inoculated with *Azospirillum* sp., under drought stress. *International Journal of Botany*, 5 (2009), 244-249.

Asnaghi, C., Kaye, C., Paulet, F., Grivet, L., Glaszmann, J.C, e D'Hont, A. Utilization of the syntenic relationship between sugarcane, sorghum, maize and rice to saturate a targeted area in sugarcane. *Plant and Animal Genomes Conference*, 7 (1999).

Ayeh, K.O. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 7 (2008), 331-341.

Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., e Loon, L.C.V. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97 (2007), 239–243.

Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F., e Döbereiner, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13 (1992), 65-73.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., e Dobereiner, J. Characterization of 'Herbaspirillum Seropedicae' Nov. Sp a root associated nitrogen fixing bacterium. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 36 (1986), 86-93.

Baldani, J.I., Caruso, L.V., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., e Döbereiner, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biological Biochemistry*, 29 (1997), 911-922.

Baldani, J.I., Oliveira, A.L.M., Guimarães, S.L., Baldani, V.L.D., Reis Jr., F.B., Silva, L.G., Reis, V.M., Teixeira, K.R.S., e Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs. Em: *Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity*. Springer Netherlands, 2000.

Baldani, J.I., Pot, B., Kirchoof, G., Falsen, E., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L., Horste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., e Dobereiner, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum Rubrisubalbicans* Comb. Nov. and classification of a group of clinical isolates (Ef Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. *International Journal de Systematic Bacteriology*, 46 (1996), 802-810.

Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., e Nath, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28 (2010), 94–107.

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., e Eddy, S.R. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research Database*, 32 (2004), D138-D141.

Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., e Bhattarai, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32 (2007), 501–510.

Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V., Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M.M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simão, T., Macedo, J., Valadão, A., Dreschel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., de Souza Filho, Gonçalo, Flores, V.M.Q., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Macedo, J., Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A.B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rössle, S.C., Ürményi T., Pereira, A.R., Silva, R., Rondinelli, E., von Krüger, W., Martins, O., Baldani, J.I. e Ferreira, P.G.C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10:450 (2009), 1-17.

Blanco, Y., Blanch, M., Pin, D., Legaz, M.E., e Vicente, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *Journal of Biosciences and Biological Engineering*, 4 (2005), 366-371.

Blödner, C., Goebel, C., Feussner, I., Gatz, C., e Polle, A. Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in *Arabidopsis thaliana* progenies. *Plant, Cell and Environment*, 30 (2007), 165–175.

Boddey, R.M. e Döbereiner, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Biology and Fertility of Soils*, 42 (1995), 241-250.

Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V.M., e Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane. *Plant Soil*, 137 (1991), 111-117.

Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., e Manners, J.M. Role for the GCC-Box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132 (2003), 1020-1032.

Büttner, M. e Singh, K.B. Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997), 5961-5966.

Caruso, L.V. e Baldani, J.I. Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using LacZ-fusion. *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The role of Biological Nitrogen Fixation* (1995), 108.

Casanovas, E.M., Barassi, C.A., e Sueldo, R.J. Azospirillum inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal Research Communications*, 30, pp. 343-350 (2002).

Cavalcante, J.J.V. *Caracterização de fatores de transcrição da via de sinalização do etileno modulados durante a associação entre cana-de-açúcar (Saccharum spp.) e bactérias diazotróficas endofíticas*. Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

Cavalcante, V.A. e Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 108 (1988), 21-31.

Cavalcante, J.J.V., Vargas, C., Nogueira, E.M., Vinagre, F., Schwarcz, K., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., e Hemerly, A.S. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 58 (2007), 673-686.

Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., e Cho, M.J. BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology*, 132 (2003), 1961-1972.

Chung, K.M., Igari, K., Uchida, N., e Tasaka, M. New perspectives on plant defense responses through modulation of developmental pathways. *Molecular Cell*, 26 (2008), 107-112.

D'Haeze, W. e Holsters, M. Nod factor, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12, pp. 79R-105R (2002), 79-105.

Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J.F., e Harris, J.M. Absciscic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 2681–2695, 20 (2008).

Döbereiner, J., Reis, V.M., e Lazarini, A.C. New N₂-fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In *Nitrogen fixation: hundred years after*. Gustav Fischer, Stuttgart, 1988.

Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Cabadilla, C.F., Ortega, E., e Rodes, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (A new role for the apoplast). *Plant Physiology*, 105 (1994), 1139-1147.

Dye, D.W. *Xanthomonas*. Em: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N.W. Schaad (Ed.), 1980.

Etheridge, N., Chen, Y.-F., e Schaller, G.E. Dissecting the ethylene pathway of *Arabidopsis*. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 3(2005), 372–381.

FAO. 2009. FAOSTAT. [Online] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 23 de 06 de 2009. [Citado em: 30 de Julho de 2009.] <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., e Ohme-Takagi, M. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC Box-mediated gene expression. *The Plant Cell*, 12 (2000), 393–404.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., e Shinozaki, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (2006), 436–442.

Gillis, M., Kersters, L.K., Hoste, L.B., Janssens, L.D., Kroppenstedt, L.R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., e De Ley, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 39 (1989), 361-364.

Goormachtig, S., Capoen, W., e Holsters, M. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Science*, 9 (2004), 518-522.

Grivet, L. e Arruda, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 122-127 (2001).

Gupta, P.K., Roy, J.K., e Prasad, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* (2001), 524-535.

Hale, C.N. e Wilkie, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. *New Zeland Journal of Agriculture Research*, 15 (1972), 448-456.

Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X.J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H., e Ashikari, M. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*, 46 (2009), 1026-1031.

Heil, M. e Bostock, R.M. Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89 (2002), 503-512.

Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M.F., e Chambert, R. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal*, 309 (1995), 113-118.

Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X., e Bent, A.F. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*, 119 (1999), 935-950.

Huang, D., Wu, W., S.R., Abrams, e Cutler, A.J. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*, 59 (2008), 2991-3007.

Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., e Métraux, J.-P. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (2003), 851-858.

Iniguez, A.L., Dong, Y., Carter, H.D., Ahmer, B.M.M., Stone, J.M., e Triplett, E.W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (2005), 169-178.

Inman-Bamber, N.G., Bonnett, G.D., Smith, D.M., e Thorburn, P.J. Sugarcane Physiology: Integrating from cell to crop to advance sugarcane production. *Field Crops Research*, 92, 115-117 (2005).

James, E.K. e Olivares, F.L. Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Graminaceous Plants by Endophytic Diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17 (1997), 77-119.

James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J. I., e Döbereiner, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, 48 (1997), 785-797.

- James, E.K., Olivares, F.L., Oliveira, A.L.M., dos Reis Jr, F., da Silva, L.G., e Reis, V.M.** Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52, 357 (2001).
- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., e Döbereiner, J.** Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, 45 (1994), 757-766.
- Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., e Martinez-Romero, E.** *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, DNA isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 63 (1997), 3676-3683.
- Johnson, P.R. e Ecker, J.R.** The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics*, 32 (1998), 227-254.
- Jones, J.D.G. e Dangl, J.L.** The plant immune system. *Nature*, 444 (2006), 323-329.
- Jung, J., Won, S.Y., Suh, S.C., Kim, H.R. Jeong, R.WY., Hwang, I., e Kim, M.** The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* (2007), 225 (2007), 575-588.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., Ryu, C.-M., Yang, K.Y., Chung, G.C., e Cho, B.H.** Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (2008), 1643-1653.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M., e Zhang, S.A.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94 (2004), 1259-1266.
- Knoester, M., Pieterse, C.M. J., Bol, J.F., e Van Loon, L.C.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-sepdependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (1999), 720-727.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., e Nei, M.** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17 (2001), 1244-1245.
- Letunic, I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P., e Bork, P.** SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Research Database*, 32 (2004), 142-144.
- Li, H.-L. e Chye, M.-L.** *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with an ethylene-responsive element-binding protein, AtEBP, via its ankyrin repeats. *Plant Molecular Biology*, 54 (2004), 233-243.

- Li, H.E., Xiao, S., e Chye, M.-L.** Ethylene- and pathogen-inducible Arabidopsis acyl-CoA-binding protein 4 interacts with an ethylene-responsive element binding protein. *Journal of Experimental Botany*, 59 (2008), 3997–4006.
- Livak, K.J. e Schmittgen, T.D.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25 (2001), 402–408.
- Logemann, J., Shell, J., e Willmitzer, L.** Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 57 (1987), 16-20.
- Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G., e Gresshoff, P.M.** Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Annals of Botany*, (2009) 1-9.
- Mauch-Mani, B. e Mauch, F.** The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (2005), 409-414.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.-R., Udvardi, M.K., e Kazan, K.** Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, 139 (2005), 949–959.
- Mehnaz, S. e Lazarovits, G.** Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbiological Ecology*, 3 (2006), 326-335.
- Memelink, J.** Regulation of gene expression by jasmonate hormone. *Phytochemistry*, 70 (2009), 1560-1570.
- Miché, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., e Reinhold-Hurek, B.** Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 19 (2006), 502-511.
- Muñoz-Rojas, J. e Caballero-Mellado, J.** Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 46 (2003), 454-464.
- Murashige, T. e Skoog, F.A.** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 47 (1962).
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Gum, K.U., Park, K.D., Son, C.Y., Sa, T., e Caballero-Mellado, J.** Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Journal of Systematic Applied Microbiology*, 283 (2005), 277-286.

- Nair, N.V., Nair, S., Sreenivasan, T.V., e Mohan, M.** Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46 (1999), 73–79.
- Nakagawa, T. e Kawaguchi, M.** Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiology*, 47 (2006), 176-180.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., e Shinshi, H.** Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 140 (2006), 411-432.
- Nogueira, E.M.; Vinagre, F.; Masuda, H.P.; Vargas, C.; Pádua, V.L.M.; Silva, F.R.; Santos, R.V.; Baldani, J.I.; Ferrera, P.C.G.; e Hermerly, A.S.** Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (2001), 1-4.
- Ogawa, T., Pan, L., Kawai-Yamada, M., Yu, L.H., Yamamura, S., Koyama, T., Kitajima, S., Ohme-Takagi, M., Sato, F., e Uchimiya, H.** Functional analysis of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiology*, 138 (2005), 1436–1445.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., e Ohme-Takagi, M.** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, 13 (2001), 1959–1968.
- Olivares, F.L.** *Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (Saccharum sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero Herbaspirillum*. Tese de Doutorado, 1997.
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J. I, e Döbereiner, J.** Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, 135 (1997), 723-737.
- Olivares, F.L., Reis, V.M. e Façanha, A.R.** The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development. Em *Nitrogenfixation: Global perspectives*. CAB International, 2002.
- Oliveira, A.L.M., Urquiaga, S., Döbereiner, J., e Baldani, J.I.** The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242 (2002), 205–215.
- Ortega-Martinez, O., Pernas, M., Carol, R.J., e Dolan, L.** Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*, 317 (2007), 507-510.
- Pan, L., Kawai, M., Yu, L.-H., Kim, K.-M., Hirata, A., Umeda, M., e Uchimiya, H.** The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Letters*, 508 (2001), 375-378.

- Paula, M.A., Reis, V.M., e Döbereiner, J.** Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biological Fertility of Soils*, 11 (1991), 111-1.
- Pedraza, R.O.** Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (2008), 25–35.
- Penmetsa, R.V. e Cook, D.R.** A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*, 275 (1997), 528-530.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., e Broekaert, W.F.** Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 (1998), 2103-2113.
- Pieterse, C.M.J. e Van Loon, L.C.** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (2004), 456-464.
- Pieterse, C.M.J., van Pelt, J.T.J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.-P., e van Loon, L.C.** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (2000), 123-134.
- Pimentel, J.P., Olivares, F., Pitard, R.M., Urquiaga, S., Akiba, F., e Döbereiner, J.** Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, 137 (2001), 61-65.
- Pozo, M.J. e Azcon-Aguilar, C.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (2007), 393-398.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., e de Kock, M.J.D.** Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 19 (2006), 699-710.
- Reis, V. M., Olivares, F.L. e Döbereiner, J.** Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: (1994), 101-104.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., e Yu, G.** *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (2000), 2105-2110.
- Rout, M.E. e Chrzanowski, T.H.** The invasive *Sorghum halepense* harbors endophytic N₂-fixing bacteria and alters soil biogeochemistry. *Plant Soil*, 315 (2009), 163-172.

Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., e Benkova, E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, 19 (2007), 2197-2212.

Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., e Paré, P.W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134 (2004), 1017-1026.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., e Yamaguchi-Shinozaki, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290 (2002), 998-1009.

Saravanan, V.S., Kalaivasan, P., Madhaiyan, M., e Thangaraju, M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Letters of Applied Microbiology*, 3 (2007), 235-241.

Schmidt, M.A. *Envolvimento Do Sistema De Secreção Do Tipo III De Herbaspirillum Rubrisubalbicans Na Interação Fitopatogênica*. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2009.

Schwessinger, B. e Zipfel, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion Plant Biology*, 11 (2008), 389-395.

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., e Pieterse, C.M.J. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, 11 (2009), 90-96.

Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N., e Kennedy, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wildtype and Nif⁻ mutant strains. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 3 (2001), 358-366.

Sharp, R.E. e LeNoble, M. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53 (2002), 33-37.

Song, C.P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Wang, P., e Zhu, J.K. Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, 17 (2005), 2384-2396.

Stepanova, A.N. e Jose M Alonso, J.M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (2009), 548-555.

Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G.T., Sandberg, G., Bhalerao, R., Ljung, K., e Bennett, M.J. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell*, 19 (2007), 2186-2196.

Tang, W., Charles, T.M., e Newton, R.J. Overexpression of the pepper transcription factor CaPF1 in transgenic Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) confers multiple stress tolerance and enhances organ growth. *Plant Molecular Biology*, 59 (2005), 603–617.

Tatusova, T.A. e Madden, T. L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 174 (1999), 247-250.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., e Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24 (1997), 4876-4882.

Tiwari, S.B., Hagen, G., e Guilfoyle, T.J. Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*, 16 (2004), 533–543.

Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., e Pieterse, C.M.J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 15 (2002), 27-34.

Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., e Boddey, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, 56, (1992), 105-114.

Vallad, G.E. e Goodman, R.M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44 (2004), 1920–1934.

Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., e Pieterse, C.M.J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70 (2009), 1581-1588.

Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M.J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J., e Pieterse, C.M.J. MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146 (2008), 1293-1304.

Van Loon, L.C. e Bakker, P.A.H.M. Root-associated bacteria inducing systemic resistance. Em: Plant-Associated Bacteria. Springer, Dordrecht, 2006.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., e Pieterse, C. M. J. Systemic Resistance Induced by rhizosphere bacteria (1998), 453-483.

- Van Oosten, V.R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Dicke, M., e Pieterse, C.M.J.** Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 21 (2008), 919-930.
- Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., e Pieterse, C.M.J.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion Plant Biology*, 11 (2008), 443-448.
- Vargas, C., de Pádua, V.L.M., Nogueira, E.M., Vinagre, F., Masuda, H.P., da Silva, F.R., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., e Hemerly, A.S.** Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis*, 35 (2003), 159-180.
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L.C., e Pieterse, C. M. J.** The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17 (2004), 895-908.
- Vernie, T., Moreau, S., Billy, F. de, Plet, J., Combier, J.-P., e Rogers, C.** EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 20 (2008), 2696-2713.
- Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M., da Silva, A.M., Ferro, M.I.T., Silva, F.H., Giglioti, E.A., Lemos, M.V.F., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., França, S.C., Bacci Jr., M., Goldman, M.H.S., e Gomes, S.L.** Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research*, 13 (2003), 2725-2735.
- Vettore, A.L., Silva, F.R. da, Kemper, E.L., e Arruda, P.** The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (2001), 1-7.
- Vinagre, F., Vargas, C., Schwarcz, K., Cavalcante, J., Nogueira, E. M., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., e Hemerly, A.S.** SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *Journal Of Experimental Botany*, 57 (2005), 559-569.
- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D., e Huang, R.** Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, 55 (2004), 183-192.
- Welsch, R., Maass, D., Voegel, T., DellaPenna, D., e Beyer, P.** Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 145 (2007), 1073-1085.
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.C., e Huang, R.** Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiology*, 148 (2008), 1953-1963.

- Yang, J., Kloepper, J.W., e Ryu, C.-M.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Science*, 14 (2009), 1-4.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., e Wu, K.** Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology*, 58 (2005), 585-596.
- Yi, S.Y., Kim, J.H., Joung, Y.H., Lee, S., Kim, W.T., Yu, S.H., e Choi, D.** The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136 (2004), 2862-2874.
- Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H.N., Shaharoona, B., e Arshad, M.** Effectiveness of rhizobacteria containing ACC seaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal Microbiologic Biotechnology*, 18 (2008), 958–963.
- Zhang, H., Liu, W., Wan, L., Li, F., Dai, L., Li, D., Zhang, Z., e Huang, R.** Functional analyses of ethylene response factor JERF3 with the aim of improving tolerance to drought and osmotic stress in transgenic rice. *Transgenic Research, Online First* (20/01/2010) (2010).
- Zhu, Y., Cai, X.L., Wang, Z.Y., e Hong, M.M.** An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the rice Wx gene. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278 (2003), 47803-47811.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., e Vidaver, A.K.** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied And Environmental Microbiology* (2002), 2198-2208.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)