

Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Maria Inês Tiraboschi Ferro¹, Neli Martins de Barros^{1,2}, Karina Maria Dabbas^{1,2}, Marcelo Luiz de Laia^{1,2}, Katia Cristina Kupper^{1,3}, Vicente Alberto de Moraes⁴, Julio Cezar Franco de Oliveira¹, Jesus Aparecido Ferro¹, Sonia Maria Zingaretti¹

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, Km 5, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP.²Bolsista da FAPESP. ³Instituto Biológico, CEP 04014-002, São Paulo-SP. ⁴Centro de Tecnologia Canavieira, Caixa Postal 162, Piracicaba, São Paulo. Autora para correspondência: Maria Inês T. Ferro, e-mail: mitferro@fcav.unesp.br

Data de chegada: 16/02/2005. Aceito para publicação em: 06/10/2006.

1173

RESUMO

Ferro, M.I.T., De Barros, N.M., Dabbas, K.M., Laia, M.L., Kupper, K.C., Moraes, V. A. de, Ferro, J. A. Zingaretti, S. Análise do perfil de expressão de genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.2, p.154-166, 2007.

Utilizando a técnica de macroarranjos de cDNA em membranas de náilon, analisou-se o perfil de expressão de 3.575 ESTs (“Expressed Sequence Tags”) de cana-de-açúcar, oriundas do projeto SUCEST, em duas variedades, uma tolerante (SP80-0185) e outra suscetível (SP70-3370) ao Raquitismo da Soqueira. Foram analisadas amostras foliares de plantas inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente etiológico do Raquitismo, contrastadas com plantas não inoculadas (controle), para cada variedade, marcadas com sondas de cDNA e hibridizadas contra os macroarranjos. Após as hibridizações e análises estatísticas dos dados foi possível identificar 49 ESTs com expressão alterada, sendo 44 na variedade tolerante (41 ESTs induzidos e 3 reprimidos) e 5 na variedade suscetível (2 ESTs induzidos e 3 reprimidos). Os resultados obtidos sugerem que a tolerância da variedade SP80-0185 de cana-de-açúcar à bactéria fitopatogênica pode estar relacionada

com a percepção de sinais extracelulares, visto que ESTs relacionados a vias de transdução de sinais apresentaram expressão gênica induzida na variedade tolerante, os quais codificam para uma EST com similaridade à H⁺-ATPase da membrana plasmática, fatores de transcrição G-box, OsNAC6, “DNA binding”, família MYB e “Zinc Finger” e ainda uma EST com similaridade ao fator de ligação ao G-Box, o qual corresponde a uma seqüência de DNA *cis* presente em vários promotores de plantas e requerido para o reconhecimento de muitos estímulos ambientais. Na variedade suscetível foi reprimido uma EST com similaridade à lipase. Esta enzima, também de membrana, faz parte da síntese do jasmonato, o qual ativa as defesas vegetais contra patógenos de plantas. Possíveis funções para os genes induzidos ou reprimidos nas cultivares de cana tolerante ou resistente ao Raquitismo são discutidas neste trabalho.

Palavras-chave adicionais: macroarranjos de cDNA, interação planta-patógeno, cana de açúcar, raquitismo da soqueira

ABSTRACT

Ferro, M.I.T., De Barros, N.M., Dabbas, K.M., Laia, M.L., Kupper, K.C., Moraes, V. A. de, Ferro, J. A., Zingaretti, S.M. Differential gene expression in sugar cane infected by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.2, p.154-166, 2007.

The macroarray nylon membrane technology was used to study the differential gene expression of 3.575 ESTs clones from sugarcane libraries. Total RNA was extracted from two varieties, one known as tolerant (SP80-0185) and another known as susceptible (SP70-3370) to the ratoon stunting disease (RSD), after being inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* bacterial extracts, and used as probe. Out of the 3.575 ESTs, 49 showed differential expression levels. Most of the selected ESTs were found in the resistant variety, 41 being induced and 3 being repressed in response to bacterial inoculation. On the other hand, the susceptible variety showed only 5 differentially expressed genes, 2 being induced and 3 being repressed. These results indicate that the tolerance to bacterial infection could be associated to extracellular signal perception because ESTs associated to signal transduction

pathways were induced in the variety SP80-185, e.g. plasma membrane H⁺ ATPase EST. Also, ESTs related to transcription factor expression, such as G-box, OsNAC6, “DNA binding”, MYB family, Zinc Finger were induced in the tolerant variety after infection. An EST with high similarity to G-Box binding factor, a *cis*-DNA sequence present in some plant promoter genes required to signal transduction for environmental signals, was also induced. Even though the susceptible variety had no significant difference in gene expression, a lipase-like EST was repressed when plants were infected. Lipase, a membrane enzyme, is also involved in jasmonate biosynthesis, which plays a major role in plant defense mechanisms. Putative roles for induced and repressed genes in both tolerant and susceptible varieties are discussed here.

Additional keywords: cDNA macroarray, plant-pathogen interaction, ratoon stunting disease, sugarcane.

Desde os tempos do Brasil colônia a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma grande fonte de riqueza para a economia brasileira (33). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo obtido uma produção recorde de 386 milhões de toneladas no biênio de 2004/2005 (38).

A região Centro-Sul se apresenta como a maior produtora, responsável por mais de 70% da produção nacional, sendo que no Estado de São Paulo se concentra a maioria das lavouras de cana-de-açúcar, com cerca de 50 mil produtores e 308 unidades de processamento industrial, produzindo 17,7 milhões de toneladas de açúcar e 13,7 milhões de m³ de etanol por ano. Os Estados de Alagoas, Pernambuco, Minas Gerais e Rio de Janeiro são, também, importantes produtores, contribuindo em conjunto com quase 30% da safra brasileira (33).

Apesar de toda essa magnitude, a cultura da cana-de-açúcar enfrenta problemas que podem contribuir para diminuir a produtividade, dentre os quais podem se destacar as doenças e, em especial, o raquitismo da soqueira (RS) causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

O raquitismo da soqueira tem sido identificado em quase todas as áreas do mundo em que se produz cana-de-açúcar. Variedades suscetíveis ao patógeno apresentam colmos finos e internódios curtos. No entanto, tais sintomas externos podem ser confundidos com aqueles causados por tratos culturais inadequados, ou insuficiência de água e/ou de fertilizantes.

A ausência de genótipos imunes, a não observância de técnicas de controle, como a termoterapia durante a produção de mudas, bem como a não descontaminação das ferramentas utilizadas durante o plantio e a colheita, têm contribuído para a ocorrência generalizada do RS (13). Além disso, a ausência de sintomas específicos e de métodos de diagnose precisos e rápidos têm dificultado o controle da doença.

Considerando que o plantio de variedades resistentes ou tolerantes apresenta-se como um método prático e seguro para o controle de doenças de plantas, além de ser ecologicamente correto, torna-se imprescindível o conhecimento acerca das respostas que os vegetais desenvolvem quando atacados por patógenos. O acúmulo de conhecimentos sobre as interações planta-patógeno deverá contribuir para a obtenção de variedades mais resistentes ao ataque de patógenos e mais adaptados à nova dinâmica mundial de sustentabilidade dos recursos ambientais.

Desse modo, o conhecimento de genes expressos diferencialmente durante o processo de infecção poderá auxiliar a elucidar os mecanismos de respostas da planta que levam à tolerância ao RS. A identificação de genes induzidos na variedade tolerante infectada pelo patógeno pode levar, ainda, ao estabelecimento de genes candidatos utilizáveis como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, ou no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas agregando características desejadas.

Diante da relevância destes aspectos, o perfil de expressão de 3.575 clones (ESTs) de cana-de-açúcar foi estudado utilizando a técnica de macroarranjo de cDNA, permitindo a análise do perfil de expressão gênica de plantas inoculadas com a fitobactéria em contraste com o perfil obtido para plantas não inoculadas (utilizadas como controle), em variedades de cana suscetível e tolerante ao Raquitismo da Soqueira. Possíveis funções para os produtos dos genes diferencialmente expressos serão discutidos.

Produção e inoculação de mudas de cana-de-açúcar

A produção e inoculação de mudas das duas variedades de cana-de-açúcar utilizadas neste estudo, SP80-0185 (tolerante) e SP70-3370 (suscetível) foram realizadas no CTC (Centro de Tecnologia Canavieira - Piracicaba-SP). Os toletes de cana-de-açúcar previamente inoculados com a bactéria fitopatogênica, foram plantados no mês de outubro e coletados em julho. Durante o cultivo das plantas utilizou-se adubação corretiva, baseada em análise do solo e tratos culturais inerentes à cultura. A infestação de ervas daninhas foi controlada manualmente, de modo a evitar a contaminação das parcelas de plantas que não foram inoculadas.

O inóculo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi feito com a cepa CTCB07, isolada no CTC, a mesma utilizada para o seqüenciamento deste genoma (projeto financiado pela FAPESP). A inoculação das plantas foi realizada através de corte dos colmos no sulco de plantio com facão previamente mergulhado em uma suspensão de inóculo produzido a partir de plantas, previamente infectadas com a bactéria. A confirmação da infecção das plantas pela bactéria se deu pela análise da seiva retirada de amostras aleatórias de toletes da touceira, por pressão, e coletados em microtubos, tipo eppendorf. Amostras de 100µL de seiva foram colocadas em membranas de nitrocelulose (0,45µm) que após secagem em estufa foram reveladas com antisoro de coelhos imunizados com *L. xyli* subsp. *xyli* (6).

Os experimentos de inoculação do fitopatógeno em plantas tolerantes e suscetíveis foram montados em uma área experimental, localizada no CTC, com 60 plantas, tendo-se 4 repetições para cada tratamento, dispostas em blocos casualizados. As plantas suscetíveis inoculadas e controle foram cultivadas no mesmo local, apenas em blocos diferentes. O mesmo delineamento foi utilizado para a variedade tolerante. Deste experimento foram coletadas 3 amostras de plantas de cada tratamento para a realização da análise de expressão gênica por macroarranjo.

Extração de RNA total dos tecidos de cana-de-açúcar

Decorridos 9 meses do plantio, amostras de tecido foliar (das duas variedades de cana-de-açúcar, inoculadas e não inoculadas), foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para serem posteriormente armazenadas a -80 °C.

O RNA total foi isolado de amostras individuais de folhas de cana-de-açúcar, incluindo as nervuras, utilizando solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Três gramas de tecido foram macerados em N₂ líquido, homogeneizados em 15 mL de Trizol Reagent (Invitrogen) e mantidos por cinco minutos a temperatura ambiente (24°C). Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL do reagente Trizol e, então, as amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Após as amostras serem centrifugadas a 7.500 x g por 15 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15mL. Adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1mL de reagente Trizol usado na homogeneização inicial. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos e depois centrifugada a 12.000 x g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1 mL de etanol para cada 1 mL de reagente Trizol utilizado na homogeneização inicial). As amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas à 7.500 x g por 5 minutos. O pélete de RNA foi dissolvido em água livre de RNase (água tratada com dietilpirocarbonato DEPC) e armazenado à -80 °C.

A quantificação do RNA extraído foi feita em biofotômetro (Eppendorf), na diluição de 1:10 (v/v). As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, utilizando-se água DEPC para o ajuste inicial do aparelho. A qualidade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 6,7% de formaldeído (v/v).

Preparação de membranas para macroarranjo

Para realização do ensaio foram utilizadas um conjunto de 4 membranas de alta densidade confeccionadas a partir de DNA plasmidial de bactérias recombinantes contendo todos os ESTs das bibliotecas de folha (LV) e de cartucho (LR) produzidas no projeto Sucest (40). Uma membrana foi utilizada para cada tratamento realizado em triplicata, respectivamente. As amostras de DNA plasmidial contendo os ESTs da cana foram obtidas por meio de micro-preparação realizada através de lise alcalina em placas de 96 poços.

Foram transferidas 3.575 amostras de DNA plasmidial para membrana de náilon de 85 x 125 mm, carregada positivamente (Genetix), com o auxílio de um sistema robotizado (Q-BOT-GENETIX-UK) do Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (3). As amostras foram depositadas em duplicata com espaçamento de 900 micron entre pontos, num arranjo 5x5, incompleto, perfazendo um total de 7.150 pontos por membrana. Após a transferência do DNA, as membranas foram submetidas a tratamento em solução de desnaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) e de neutralização (NaCl 1,5M e Tris Base 1M pH 7) por 5 e 10 min, respectivamente e, logo em seguida, o DNA foi imobilizado à membrana por meio de radiação com luz UV (1600 joules/cm²), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix,UK).

Hibridizações

Síntese da sonda de cDNA

As sondas foram produzidas seguindo o protocolo descrito por Schummer (35) com modificações. 30µg de RNA total foram transformados em cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen) em seu tampão de síntese 1X acrescido de iniciador Oligo dT (dT₁₈VN, Invitrogen), nucleotídeos não marcados (dATP, dTTP, dGTP a 10 mM cada) e 30 mCi de [α ³²P] dCTP, seguido de incubação por 30 minutos a 42 °C. Adicionou-se a seguir dCTP não marcado para a concentração final de 1mM e a reação prolongou-se por mais 60 minutos. A sonda foi purificada em coluna de Sephadex G-50 (34).

Síntese da sonda oligo-vetor

Para verificação da homogeneidade de deposição do DNA plasmidial nas membranas, estas foram hibridizadas com uma sonda construída a partir de um fragmento de 40 pares de base do gene de resistência à ampicilina presente no vetor pSPORT1. O fragmento foi amplificado pela reação de cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos 5'-GTG GTC CTG CAA CTT TAT CCG C-3' e 5'-TAG ACT GGA TGG AGG CGG ATA A-3' na presença de [α ³²P]dCTP, de acordo com o protocolo descrito por McPherson em <http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html> (21). No momento da análise das membranas foram excluídas as ESTs cujos pontos apresentaram um sinal de intensidade fraca (menor que 10% da média de todos os pontos da membrana), bem como as ESTs cujas réplicas apresentaram sinais com intensidade muito variáveis (razão maior que dois entre o maior e o menor sinal).

Pré-hibridização e hibridização de membranas de alta densidade

As hibridizações foram realizadas seguindo o protocolo descrito por McPherson (21). Para diminuir o background, as membranas foram colocadas inicialmente em solução SDS 0,1% fervente, seguindo as recomendações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 58 °C, por 4h na primeira vez que foram utilizadas e por 2 horas nas demais utilizando-se um volume de 10 mL e solução (1% BSA, 7% SDS, tampão fosfato de sódio 1M pH 7,0) por membrana. As membranas foram hibridizadas em 10 mL da mesma solução, qual foi adicionada a sonda purificada, por 18 horas, a 58 °C.

Lavagem das membranas

Após a hibridização, procedeu-se a lavagem das membranas para retirada do excesso de sonda e das hibridizações inespecíficas, que possivelmente tenham ocorrido. As membranas foram lavadas três vezes, por períodos de 30 minutos a 58 °C, de maneira sucessiva, com aproximadamente 100 mL das seguintes soluções: 2xSSC + 0,1%SDS; 1,5xSSC + 0,1% SDS; 0,5xSSC + 0,1% SDS, respectivamente. Após as lavagens as membranas foram seladas e expostas em cassetes (Imagem Plate-Fujifilm) por um período de 96 h. As imagens foram captadas e digitalizadas utilizando-se um leitor de imagens (*Phosphoimager FLA3000-G* -Fujifilm, Tokyo).

Remoção da sonda

Para a remoção da sonda as membranas hibridizadas foram lavadas duas vezes, por períodos de 15 minutos a 65 °C, com 100 mL de solução pré-aquecida a 65 °C por membrana contendo 0,4N NaOH + 0,1% SDS e lavadas duas vezes a temperatura ambiente com uma solução de 0,1% SDS + 0,1% SSC + 0,2N Tris-HCl pH 8.0. As membranas foram novamente seladas e colocadas nos cassetes por períodos de 96 horas. A eficiência da remoção da sonda foi monitorada repetindo-se o processo de leitura do fósforo radioativo (FLA-3000-Fujifilm).

Análises Estatísticas

As imagens obtidas foram analisadas, individualmente, pelo programa "Array Vision" versão 8.0 (Imaging Research, St. Catherines, ON, Canada), o qual transforma as intensidades de sinal emitidas por cada ponto (EST) da membrana em valores numéricos. Esses valores foram armazenados em uma planilha eletrônica com três colunas, sendo que na primeira havia a informação do ponto (EST) na membrana a que esta linha se referia, na segunda os valores brutos obtidos para este ponto e na terceira coluna os valores de background, também referente a esse mesmo ponto.

Essa planilha eletrônica foi lida no programa MS Excel (Microsoft, Redmond, WA), onde o valor líquido para cada ponto (EST) da membrana foi obtido, subtraindo-se o respectivo valor de background do respectivo valor bruto para cada um dos pontos (EST) analisados. Uma vez que havia dois pontos na membrana referentes a um mesmo EST, obteve-se a média desses dois pontos para todos os EST analisados.

Uma segunda planilha foi gerada onde na primeira coluna havia todos os EST analisados e nas demais colunas os valores líquidos obtidos para cada um desses pontos, sendo cada uma dessas colunas referentes a uma membrana analisada. Em seguida, os valores líquidos foram transformados para *log* na base dois a fim de normalizar os dados para posterior análise estatística.

Os dados transformados foram organizados conforme disposição requerida pelo programa SAM (“Significance Analysis of Microarrays”) (37), o qual foi utilizado para a identificação dos EST diferencialmente expressos, seguindo as orientações contidas no manual do programa (37).

O SAM baseia suas análises estatísticas em uma série de testes-*t* específicos para cada gene, adaptadas para a detecção de genes diferencialmente expressos em larga escala. Os genes que apresentaram níveis de expressão além de um certo limiar são designados como genes com resposta diferencial potencialmente significativa. Além disso, o SAM calcula o valor de “Fold Change”, que é a razão entre o valor obtido para o experimento tratado pelo valor obtido para o experimento controle para um dado gene, para cada EST e o valor de descobertas falsas (FDR) (2) para um conjunto de genes, neste caso ESTs.

A relação dos genes diferencialmente expressos foi obtida ajustando o valor delta do SAM de modo a obter um valor de FDR igual ou menor que 5% e “Fold Change” maior ou igual a 2 ou menor ou igual a -2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de macroarranjos de cDNA foi empregada com o objetivo de identificar o padrão de expressão gênica de duas variedades de cana-de-açúcar, uma tolerante (SP80-0185) e uma suscetível (SP70-3370) a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, bactéria causadora do Raquitismo da Soqueira em cana-de-açúcar. Nas membranas de macroarranjos utilizadas foram imobilizados 3.575 clones de plasmídeos recombinantes contendo cDNAs de folha e cartucho sequenciados pelo programa SUCEST, foram imobilizadas em membranas de náilon, gerando o macroarranjo.

Para avaliar as possíveis flutuações na quantidade de DNA depositado nas membranas foram calculados os coeficientes de variação (cv) de sinal dos pontos após a hibridização das mesmas com a sonda oligo vetor conforme metodologia utilizada por Felix et al. (9). Apenas as membranas com valores de cv inferiores a 10% foram usadas para subseqüentes análises (dados não mostrados). Na Figura 1, pode-se observar que a maioria dos pontos apresentou a mesma intensidade de

sinal, comprovando a homogeneidade na quantidade de DNA depositado roboticamente.

O perfil de expressão gênica pode ser observado pelo contraste entre membranas de náilon hibridizadas com sondas de cDNA obtidas a partir de variedade tolerante não inoculada (controle) e inoculada (tratamento) e variedade suscetível não inoculada (controle) e inoculadas (tratamento). Na Figura 2 é possível observar que não houve hibridização de todos os pontos, como verificado para a sonda do oligo-vetor que possui homologia com todas as seqüências depositadas (Figura 1). A expressão gênica diferencial pode ser aferida pela diferença observada na intensidade de sinais obtidos para um determinado ponto (EST), após hibridização com cDNAs da planta em condição controle ou tratada, que refletem, em última instância, as quantidades de RNAs mensageiros produzidos nas plantas tolerantes e suscetíveis quando inoculadas (tratadas) ou não inoculadas (controle) com o patógeno (Figura 2).

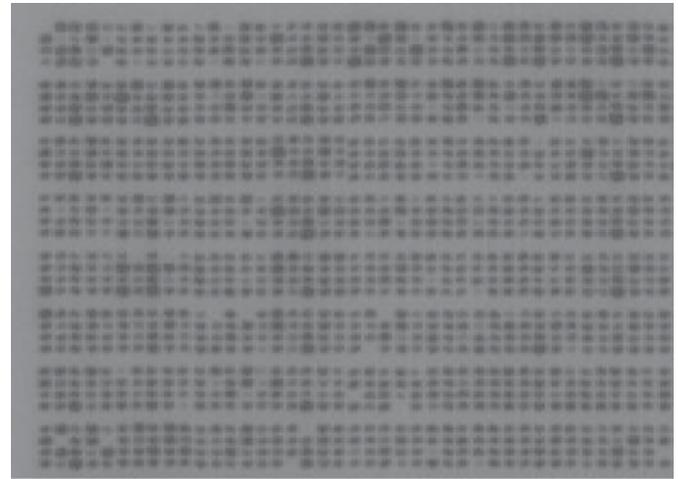


Figura 1. Imagem digitalizada de membrana de náilon 85 x 125cm, contendo 3575 clones ESTs em duplicata, preparadas a partir de DNA plasmidial de bibliotecas de folha (LV) e cartucho (LR), geradas no projeto SUCEST e hibridadas com sonda construída para reconhecer a seqüência do gene Amp^F do vetor pSPORT1, marcadas com 30 µCi de [α-³³P] dCTP.

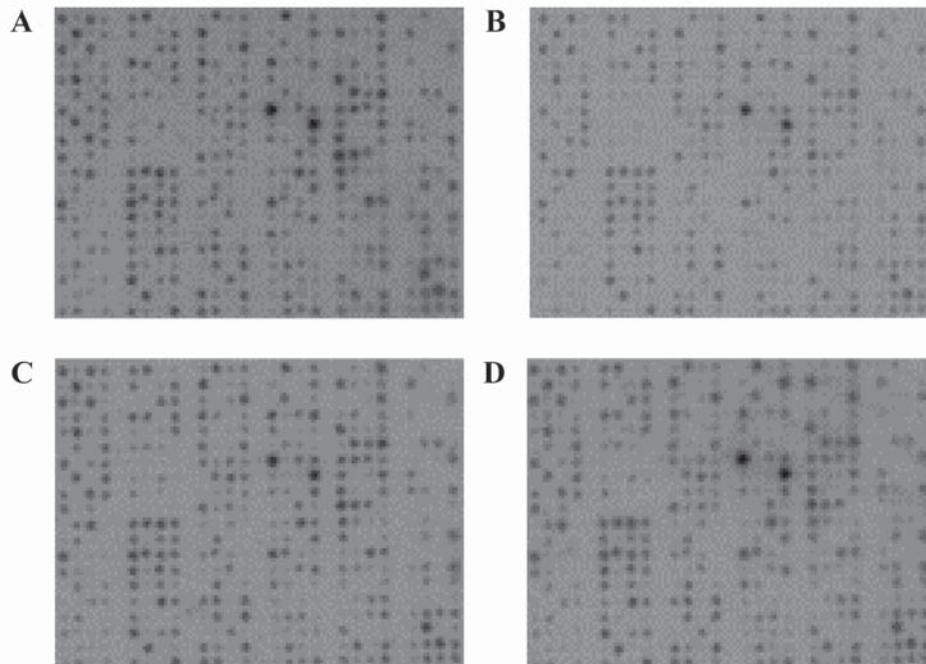


Figura 2. Imagens digitalizadas de membranas de náilon 85 x 125cm, contendo 3.575 clones ESTs em duplicata preparadas a partir de DNA plasmidial de bibliotecas de folha (LV) e cartucho (LR), geradas no projeto SUCEST. (A) Hibridização com cDNA da variedade SP80-0185, tolerante ao raquitismo da soqueira, não inoculada (controle); (B) Hibridização com cDNA de planta variedade tolerante inoculada com fitobactéria, (C) Hibridização com cDNA da variedade SP 70-3370, suscetível ao raquitismo da soqueira, não inoculada (controle), (D) Hibridização da variedade suscetível inoculada. As quatro sondas de cDNA foram marcadas com 30 µCi de [α-³³P] dCTP.

Após a realização das análises estatísticas foram gerados os gráficos de dispersão dos dados produzidos pelo programa SAM (37), para cada uma das variedades de cana investigadas (Figura 3). O comportamento da variedade suscetível quanto ao número de genes diferencialmente expressos pode ser visto na figura 3 “A”. Observa-se que as linhas tracejadas estão muito próximas da linha central, mostrando que a variedade suscetível apresentou poucos genes diferencialmente expressos na presença do patógeno bacteriano, sugerindo que esta variedade não dispara a ativação de mecanismos de defesa frente ao ataque do patógeno, ou seja, a bactéria invasora consegue colonizar os tecidos da planta hospedeira sem que a expressão de genes de resposta de defesa vegetal seja ativada. Por outro lado, quando se analisa o perfil de expressão gênica da variedade tolerante (Figura 3), observa-se que as linhas tracejadas se localizam a uma maior distância da linha central, mostrando que um número maior de genes foram diferencialmente expressos quando comparado à resposta da cultivar suscetível, o

que nos permite levantar a hipótese de que a variedade tolerante, quando na presença da fitobactéria, induz mecanismos de resposta a estresse biótico.

Após análises estatísticas comparativas das membranas foram identificadas 49 ESTs diferencialmente expressas, quando considerados os resultados obtidos para as duas cultivares, tolerante e suscetível, utilizadas neste estudo. As seqüências desses ESTs foram submetidas à busca nos bancos de dados (25, 36), por meio do algoritmo Blast-x, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Das 49 ESTs que apresentam expressão significativamente alterada, 44 foram obtidas para a variedade tolerante e 5 para a variedade suscetível. Dos genes expressos diferencialmente na variedade suscetível, 2 ESTs foram induzidas e 3 reprimidas, todas oriundas de bibliotecas de cartucho de cana-de-açúcar (LR). Já na variedade tolerante foram induzidas 41 ESTs e reprimidas 3. De 41 ESTs que foram induzidas, 36 são de biblioteca de cartucho e 5 são de biblioteca de folha (LV). Com relação às ESTs que foram

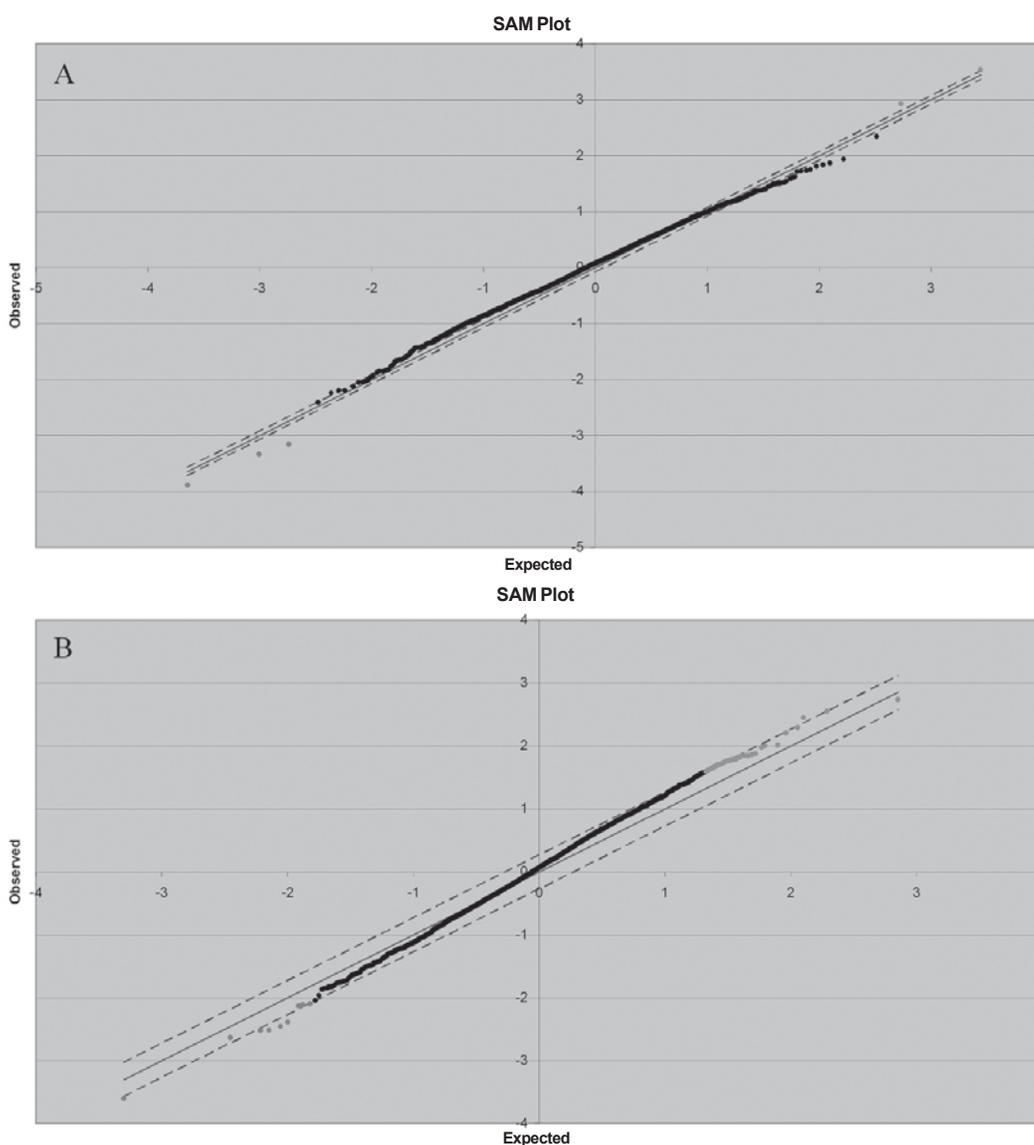


Figura 3. Gráficos de dispersão dos dados gerados pelo programa SAM (22). As linhas tracejadas indicam o nível de significância. Os genes acima ou abaixo da linha de significância são considerados induzidos ou reprimidos, respectivamente. Em “A” é apresentado o gráfico relativo a variedade suscetível e em “B” o relativo a variedade de cana-de-açúcar resistente a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

reprimidas na variedade tolerante, 2 são oriundas de biblioteca de cartucho e 1 de folha.

Quando se analisa os dados da Tabela 1, verifica-se que, embora algumas ESTs tenham sido identificadas na variedade suscetível, como tendo sua expressão alterada, a análise das seqüências em bancos de dados não permitiu a identificação das funções atribuídas às ESTs que foram induzidas, de forma que foram categorizadas como proteínas hipotéticas ou com função desconhecida. Com relação às ESTs cuja

expressão apresentaram-se reprimidas, duas correspondem a proteínas desconhecida e hipotética, respectivamente, ambas identificadas inicialmente em *Arabidopsis thaliana* e ainda uma EST com similaridade a uma proteína com atividade de lipase

Os resultados mostram que na variedade suscetível infectada com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, foi reprimida uma EST (SCCCLR1022C01, e-value 2e-58) que apresenta similaridade com motivos de lipase (Tabela 1). Em *Arabidopsis* o gene DAD1 codifica a fosfolipase A1

Tabela 1. Genes induzidos e reprimidos em cana-de-açúcar (variedade SP703370) suscetível ao Raquitismo da Soqueira.

Genes Induzidos	Seqüência	e- value	Descrição
SCBGLR1097F10	GI/22773253	2e-22	Proteína desconhecida [<i>Oryza sativa</i>]
SCEQLR1093H01	GI/16805287	2.9	Proteína hipotética [<i>Plasmodium falciparum</i>]
Genes reprimidos	Seqüência	e- value	Descrição
SCCCLR1022C01	I/20146431	2e-58	Proteína semelhante a lipase [<i>Oriza sativa</i>]
SCCCLR1076G03	GI11285694	1.00e-16	Proteína hipotética [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
SCQSLR1089C01	GI10177031	3.00e-27	Proteína desconhecida [<i>Arabidopsis thaliana</i>]

(PLA1), que catalisa a etapa inicial da biossíntese do Jasmonato (14 15) hormônio cuja expressão é induzida em múltiplas respostas de defesa de planta (12). Os Jasmonatos são derivados de ácidos graxos com 12 carbonos, os quais são sintetizados a partir de intermediários de 18 carbonos na via octadenóide (ODA) (24). Uma lipase gera o ácido linolênico, que é o primeiro precursor da via do ODA. O ácido linolênico é então convertido em ácido jasmônico e metil-jasmonato, coletivamente chamados de jasmonatos (MeJA) (1). Os jasmonatos são hormônios produzidos como resposta a estresses em plantas, agindo como reguladores da resposta de defesa vegetal contra patógenos e pragas que atacam vegetais (30). Segundo Gershenzon (12) o ácido jasmônico ativa a expressão de genes que codificam inibidores de protease produzidas por patógenos, representando assim outro mecanismo de defesa da planta, pois impedem a degradação da parede celular do vegetal, e conseqüentemente, a invasão do patógeno.

Quando se analisa os dados da Tabela 2, é possível observar que a interação entre a variedade de cana-de-açúcar tolerante à *Leifsonia* resultou no aumento da expressão de um gene relacionado a proteína de membrana que atua percebendo sinais extracelulares, H⁺-ATPase, e com fatores de transcrição G-Box, OsNAC6 Nac domínio, DNA binding, fator da família MYB e proteína similar a fatores de transcrição contendo “dedos de zinco” (“Zinc Finger”).

A resposta apropriada da planta durante o ataque de patógenos emerge da percepção de sinais extracelulares capazes de desencadear a ativação de vias de transdução de sinais nas células do hospedeiro. A especificidade das interações entre plantas e patógenos é ainda um fenômeno pouco compreendido e a elucidação deste fenômeno representa uma tarefa importante. Os resultados apresentados mostram a indução, na variedade tolerante, de uma EST (SCCCLR1070B12, e-value 4e-37) com similaridade à proteína H⁺-ATPase de membrana plasmática. Proteínas do tipo H⁺-ATPase de membrana plasmática tem um papel importante na fisiologia de plantas, constatando-se, ainda, que a atividade desta enzima é essencial para a nutrição e crescimento da planta. Enzimas da família das H⁺-ATPases de

membrana podem estar sujeitas a regulação por fatores de crescimento como hormônios e ainda por luz, os quais podem alterar a atividade da mesma (27). Moléculas H⁺-ATPase podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas pelo ataque de patógenos. Esse tipo de regulação é mediada por um domínio auto-inibitório especializado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica, que age na regulação da atividade da bomba de prótons (29). Desta maneira, esta enzima pode agir como um intermediário em certas vias de transdução de sinal, incluindo aquelas que iniciam a ativação de respostas de defesa de plantas (42). De acordo com Dixon et al. (7), a base molecular para o reconhecimento do patógeno inclui um grande número de reações associadas à resistência, que são iniciadas através da H⁺-ATPase da membrana plasmática do hospedeiro. Exemplos na literatura mostram que a ativação desta enzima pode ser apenas uma etapa em uma cascata de sinais que leva à ativação das defesas em plantas, fato este que pode ser observado em folhas de espinafre, onde algumas fitotoxinas de fungos, dentre as quais a fusicoccina, ativa uma H⁺-ATPase da membrana plasmática do hospedeiro (16, 41). Outro exemplo diz respeito ao mecanismo de resposta a *Cladosporium fulvum* pelo tomateiro, o qual envolve a ação de proteínas fosfatases, que ao desfosforilar resíduos na H⁺-ATPase da membrana plasmática promovem a ativação desta (39). Tal enzima funciona como uma bomba de prótons dependente de ATP capaz de estabelecer um gradiente de pH através da membrana (positivo no meio extra e negativo no meio intracelular) que ocasiona uma diferença de potencial (entre -100mM fora e -200mM dentro da célula) capaz de gerar energia para a captação de nutrientes (26, 29). Sabendo-se que os sintomas do raquitismo induzidos em cana pela *Leifsonia*, decorrem de estado de carência nutricional na planta, é razoável hipotetizar que a ativação da expressão da H⁺-ATPase de membrana verificada neste trabalho para a cultivar tolerante de cana (SP80-0185) pode refletir uma situação em que a planta tenta compensar o estado de carência induzido pela ação do patógeno, ativando a captação de nutrientes mediado pelo gradiente eletroquímico gerado com a ativação da H⁺-

Tabela 2. Genes induzidos e reprimidos na variedade de cana-de-açúcar tolerante ao Raquitismo da Soqueira.

Clones Induzidos	Seqüência	e- value	Descrição
SCEZLR1031F04	GI/7489731	1.00e-162	Fator de ligação ao G-box-1 milho [<i>Zea mays</i>]
SCJLLR1011F07	GI/6525246	1.2	Beta-galactosidase alfa peptídeo [cloning vector pSport1]
SCCCLR1070A08	GI/16331649	.024	Endo-1,4-beta-glucanase [<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803]
SCEZLR1031D03	GI/20851010	5.8	Semelhante a proteína de membrana de peroxisomo <i>Mus musculus</i>
SCCCLR1072D07	GI/30694961	2e-08	Semelhante miosina [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
SCQSLR1040C05	GI/13475616	5.9	Arginina deiminase
SCJLLR1105H10	GI/4220474	0	Semelhante a proteína miosina semelhante a cadeia pesada
SCAGLR2033D06	GI/21231532	1.6	Ribonuclease E [<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>]
SCAGLR1043H12	GI/50934865	7e-09	Semelhante a proteína DNA Binding
SCBFLR1005B08	GI/7442735	1.00e-130	Carregador de aminoácidos
SCSGLV1008C05	GI/7436614	9.00e-79	Frutose-bifosfato aldolase (EC 4.1.2.13) M3E9.40 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
SCQGLR2017E02	GI/22027646	.27	Semelhante a angiomotina 1; [<i>Homo sapiens</i>]
SCEPLR1008C12	GI/15220521	4e-55	RNA helicase SDE3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
SCACLV1019B11	GI/5360895	8e-10	Gene ligado a resposta a estresse salinico [<i>Triticum aestivum</i>]
SCCCLR1070B12	GI/29367383	4e-37	Semelhante a proteína de membrana plasmática H+ATPase-I [<i>Oryza sativa</i>]
SCMCLR1032F09	GI/31323806	.11	Proteína kinase serina/treonina
SCQGLR1086B04	GI/19071644	1e-28	Semelhante a proteína DNA-binding [<i>Oryza sativa</i>]
SCMCLR1124G08	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCEQLR1094D08	GI/50942503	5e-16	Semelhante a proteína da família Myb [<i>Oryza sativa</i>]
SCSFLV1048G06	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1002H04	GI/50919383	1e-56	Proteína putativa do domínio NAC [<i>Oryza sativa</i>]
SCBFLR1026H05	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1095E02	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1099C01	GI/34912488	3e-42	“far-red impaired response protein-like” [<i>Oryza sativa</i>]
SCUTLR2023C05	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCQGLV1018G04	GI/50919859	6e-73	Proteína hipotética [<i>Oryza sativa</i>]
SCVPLR2005D05	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCCCLR1070G09	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCVPLR1028G03	GI/53792247	2e-21	Semelhante a proteína lisina descarboxilase [<i>Oryza sativa</i>]
SCJFLR1073G05	GI/34900482	6e-28	Proteína hipotética [<i>Oryza sativa</i>]
SCSFLV1045C09	GI/50905717	2e-22	Proteína desconhecida [<i>Oryza sativa</i>]
SCVPLR1049G05	GI/77556570	1e-99	Proteína hipotética LOC_Os12g41670 [<i>Oryza sativa</i>]
SCUTLR2008A12	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1002B03	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBFLR1026F06	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1119G03	GI/33321018	5e-21	Proteína desconhecida [<i>Sorghum bicolor</i>]
SCACLR2007B09	GI/52076301	2e-32	Semelhante a proteína de transcrição bHLH [<i>Oryza sativa</i>]
SCJFLR1017B12	GI/ 30689543	3e-24	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCVPLR1028B05	-	-	Proteína desconhecida (“no hit”)
SCBGLR1002C04	GI/55773937	3e-98	Subunidade 10 do fator 3 de iniciação de tradução de eucariota [<i>Oryza sativa</i>]
SCJLLR1107F04	GI/ 50948297	2e-16	proteína que interage com a proteína NEP1 [<i>Oryza sativa</i>]
Clones reprimidos	Seqüência	e- value	Descrição
SCSGLV1013D10	GI/32455536	.028	Semelhante a replicase [<i>Corynebacterium glutamicum</i>]
SCAGLR1064H01	GI9711877	7.00e-07	Semelhante a cadeia alfa da ATP sintetase [<i>Oryza sativa</i>]
SCACLR1128A10	GI/55296019GI/34898648	1e-721e-72	Possível importina 9 [<i>Oryza sativa</i>] similar to RANBP9 isoform 1 [<i>Oryza sativa</i>]

ATPase codificada pelo clone SCCCLR1070B12.

Em plantas, alguns genes são expressos constitutivamente enquanto outros são capazes de responder a estímulos específicos. A capacidade de responder a estímulos externos e internos ocorre em virtude da existência de uma complexa rede de fatores de transcrição (14). A alteração na expressão de fatores de transcrição normalmente resulta em mudanças significativas no metabolismo vegetal (17). No genoma da *Arabidopsis* foram identificados mais de 1.500 fatores de transcrição que representam um dos grupos funcionais mais importantes (31). Estudos dos domínios funcionais dos fatores de transcrição de plantas, por análise funcional e mutacional têm demonstrado que estes consistem em uma sequência de ligação do fator ao DNA, e podem conter ainda sítio de oligomerização, domínio de regulação de transcrição e sinal de localização nuclear. A classificação dos fatores de transcrição depende de suas características estruturais, algumas vezes subdividida de acordo com o número e espaçamento dos resíduos conservados na maioria dos domínios (19). Em plantas a ativação da transcrição de numerosos genes é modulada pelas proteínas “DNA-binding”, que desempenham um papel fundamental na resposta de infecção por patógeno (32). As proteínas “DNA binding” participam de processos celulares importantes tais como: na replicação de DNA e regulação da expressão gênica. É interessante ressaltar que durante a infecção por *Leifsonia* a variedade tolerante de cana-de-açúcar apresentou indução gênica de duas ESTs com similaridade a proteínas “DNA binding” regulatórias (SCQGLR1086B04, e-value 4 e-79 e SCAGLR1043H12 e-value 7 e-9).

Uma EST com similaridade a genes codificando proteínas da família das proteínas com dedos de zinco (“zinc finger”), que também trata-se de um fator de transcrição, apresentou-se induzida na variedade tolerante interagindo com *Leifsonia*. Proteínas “zinc finger” apresentam alta afinidade para ligação com seqüências de DNA específicas e possuem domínios de ligação ao DNA característicos em fatores de transcrição (20)

Uma família de proteínas encontradas em plantas e animais são as da família MYB. Durante a infecção da variedade de cana-de-açúcar tolerante à fitobactéria houve a indução de uma EST (SCEQLR1094D08 e-value 5 e -16) com similaridade a proteína MYB. Esta família de proteínas possui repetições de um domínio conservado de 50 aminoácidos e atuam regulando o metabolismo de fenilpropanóides que atuam em resposta de defesa a patógenos. Em plantas estas proteínas são localizadas em tecidos específicos e estão envolvidas no controle de numerosas vias biossintéticas incluindo a produção de antocianinas e flavonóides, compostos do metabolismo secundário (28). Proteínas Myb de *Antirrhinum majus* e tabaco podem ativar o gene que codifica a primeira enzima que participa no metabolismo de fenilpropanóide, a fenilalanina amonia aliase (PAL), embora também haja evidências a respeito da atuação das proteínas MYBs, como fator de transcrição, em sítios de ativação de promotores envolvidos no metabolismo de fenilpropanóides e na biossíntese de lignina. Muitos compostos envolvidos na indução de resposta de defesa são sintetizados na via biossintética de fenilpropanóides, incluindo lignina e fitoalexinas, cuja indução em situação de ataque por patógenos levar à polimerização da parede celular, barreira primária da resistência ao patógeno (8) A deposição de compostos fenólicos na parede celular vegetal tem sido descrito em muitas espécies de plantas como uma resposta ao ataque de patógenos.

Quando a cana é confrontada com o agente do Raquitismo também podemos observar a indução de uma EST com similaridade a fatores de transcrição contendo domínio NAC (SCBGLR1002H04, e-value 1 e-56). Nos membros desta família uma seqüência de aminoácidos altamente conservada na região do N-terminal da proteína é conhecida

como domínio NAC (18). Genes codificando fatores de transcrição da família NAC são distribuídos extensamente no genoma de plantas, onde apresentam papéis importantes em processos de crescimento, desenvolvimento e senescência da planta, e ainda resposta a ferimentos e defesa contra patógenos (11).

Nossos resultados mostram também que na variedade tolerante infectada com *Leifsonia* houve a indução de uma EST (SCEZLR1031F04, e-value $1e-162$) com similaridade a um fator de transcrição que se liga a seqüências promotoras cis-ativadoras denominadas G-Box, que segundo Meier & Gruissem (22) corresponde uma seqüência de DNA cis-ativadora presente em vários promotores de plantas, sendo requerido em respostas a estímulos ambientais. Dentre os estímulos físicos e bioquímicos podemos citar: irradiação UV, ácido cumárico, frio, desidratação, anaerobiose, ácido abscísico e luz. De acordo com Ferl & Paul (10), uma ruptura da seqüência G-Box comprometeria a habilidade do promotor em responder aos respectivos estímulos. Uma característica de alguns promotores de plantas é o requerimento de pelo menos um elemento cis em adição ao G-Box para uma apropriada ativação transcricional. Um destes é o elemento que responde ao ácido abscísico (ABRE), encontrado nos promotores de vários genes que são induzidos pelo ABA. De maneira similar a outros patógenos de plantas que atuam interferindo no crescimento do hospedeiro pela produção e inibição de hormônios reguladores de crescimento do vegetal, existem evidências de que *Leifsonia* produza o hormônio ABA que em plantas atua como inibidor de crescimento assim a produção e secreção deste hormônio da planta pode contribuir para o desenvolvimento dos sintomas de raquitismo observados em plantas infectadas por este fitopatógeno (23). Podemos supor que a indução da expressão do fator de transcrição que se liga ao G-box na variedade tolerante infectada por *Leifsonia*, pode levar à produção de uma proteína capaz de neutralizar os efeitos do ABA (mimetizante) produzido pela bactéria durante o estabelecimento desta em uma variedade tolerante. Desta maneira, a indução de uma EST na variedade tolerante, com similaridade a um fator de transcrição capaz de se ligar a elemento promotor G-Box, nos permite levantar à hipótese de que a produção do ABA pela bactéria pode ser um estímulo para a expressão de genes que apresentem o elemento G-Box em seus promotores.

Leifsonia xyli subsp. *xyli* coloniza um tecido vegetal composto por células maduras que apresentam falta de protoplastos. Porém, a presença de elementos intactos no citoplasma de tecidos do xilema da cana-de-açúcar pode ser encontrada logo abaixo da região do internó podendo ser um local de aderência da bactéria na célula do hospedeiro. Tal evidência é caracterizada pela descoloração visível da região do internó em variedades de cana-de-açúcar suscetíveis (23). Como discutido acima a variedade tolerante apresenta indução de genes relacionados a percepção de sinais extracelulares e fatores de transcrição que provavelmente resultaria na ativação de genes que conferem a característica de tolerância durante a interação com esta fitobactéria.

AGRADECIMENTOS

À Centro de Tecnologia Canavieira - Piracicaba-SP pela assistência técnica e fornecimento do material biológico.

À Fapesp pela concessão de Bolsa de Doutorado (Processo nº 00/02201-3).

À professora Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, pela disponibilização do aparelho Phosphoimager FLA 3000-G.

Agradecemos especialmente a Renata Dozzi Tezza e Paula Fernanda Soares Tabatini pela ajuda na bioinformática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blechert, S.; Brodschelm, W.; Holder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T.M.; Mueller, M.J.; Xia, Z.Q.; Zenk, M.H. The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p.4099-4105, 1995.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, p.289-300, 1995.
- Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCCenter). 2001. Disponível em: <<http://www.bcccenter.fcav.unesp.br>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2005.
- Chen, J.J.; Janssen, B.J.; Williams, A.; Sinha, N. A gene fusion at a homeobox locus: alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1289-1304, 1997.
- Cook, T.; Gebelein, B.; Belal, M.; Mesa, K.; Urrutia, R. Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 274, n. 41 p. 29500-29504, 1999.
- Davis, M. J.; Gillaspie, A. G.; Harris, R. W.; Lawson, R. H. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v.210, n. 4476, p. 1365-1367, 1980.
- Dixon, R. A.; Harrison, M. J.; Lamb, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p.479-501, 1994.
- Dixon, R. A.; Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.1085-1097, 1995.
- Felix, J.M.; Drummond, R.D.; Nogueira, F.T.S.; Rosa Jr.; V.E.; Jorge, R.A.; Arruda, P.; Menossi, M. Genoma Funcional. Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biociências & Desenvolvimento**, v. 24, p.60-67, 2002
- Ferl, R.; Paul, A. Genome Organization and Expression. In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, cap.7, p.312-357.
- Fujiwara, S.; Tanaka, N.; Kaneda, T.; Takayama, S.; Isogai, A.; Che FS. Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flegellin perception in the culture rice cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v.17, n. 9, p. 986-998, 2004.
- Gershenson, J. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: Taiz, L.; Zeiger, E. **Plant Physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002, cap.1, p.283-308.
- Gillaspie J.R.; A.G.; Teakle, D.S. Ratoon stunting disease. In: Ricaud, C.; Egan, B. T.; Gillaspie Jr., A.G.; Hughes, C. G. **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. cap. 4, p.58-80.
- Guilfoyle, T. J. The structure of plant gene promoters. In: Setlow, J.K., (Ed.) **Genetic engineering principles and methods**. New York: Plenum Press, 1997. v. 19, p. 15-47.
- Ishiguro, S.; Oda-Kawai, A.; Ueda, J.; Nishida, I.; Okada, K. The *defective in anther dehiscence1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2191-2209, 2001.
- Johansson, F.; Sommarin, M.; Larson, C. Fusicoccin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.321-327, 1993.
- Kater, M. M.; Colombo, L.; Franken, J.; Busscher, M.; Masiero, S.; Van Lookeren Campagne, M.M.; Angenent, G.C. Multiple AGAMOUS homologs from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 2 p. 171-182, 1998.
- Kikuchi, K.; Ueguchi-Tanaka, M.; Yoshida, K. T.; Nagato, Y.; Matsusoka, M.; Hirano, H.Y. Molecular analysis of the NAC gene family in rice. **Molecular & General Genetics**, Germany, v.262, n. 6, p. 1047-1051, 2000.
- Liu, L.; White, M.J.; MacRae, T.H. Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation. **European Journal Biochemistry**, Cambridge, v. 262, p. 247-257, 1999.
- Margolin, J.F.; Friedman, J.R.; Meyer, W.K.; Vissing, H.; Thiesen, H.J.; Rauscher, F.J.R. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. 19- **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 91, p. 4509-4513, 1994.
- McPherson, J.D. Overgo probing of high-density filters. 2000. Disponível em: <<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>>. Acesso em: 2 jan. 2005.
- Meier, I.; Gruissem, W. Novel conserved sequence motifs in plant G-box binding proteins and implications for interactive domains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, n.3, p.470-478, 1994.
- Monteiro-Vitorello, C. B.; Camargo, L. E. A.; Van Sluys, M.A.; Kitajima, J. P.; Truffi, D.; Amaral, A. M. do; Harakava, R.; Oliveira, J. C. F. de; Wood, D.; Oliveira M. C. de; Miyaki, C.; Takita, M. A.; Silva, A. C. R. da; Furlan, L. R.; Carraro, D. M.; Camarotte, G.; Almeida Jr., N. F.; Carrer, H.; Coutinho, L. L.; El-Dorriy, H. A.; Ferro, M. I. T.; Gagliardi, P. R.; Gigliotti, E.; Goldman, M. H. S.; Goldman, G. H.; Kimura, E. T.; Ferro, E. S.; Kuramae, E. E.; Lemos, E. G. M.; Lemos, M. V. F.; Mauro, S.M. Z.; Machado, M. A.; Marino, C. L.; Menck, C. F.; Nunes, L. R.; Oliveira, R. C.; Pereira, G. G.; Siqueira, W.; Souza, A. A. de; Tsai, S. M.; Zanca, A. S.; Simpson, A. J. G.; Brumbley, S. M.; Setúbal, João C. The Genome Sequence of the Gram Positive Sugarcane Pathogen *Leifsonia xuli* subsp. *Xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v. 17, n. 8, p.827-836, 2004.
- Müller, M. J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p.653-663, 1997.
- National center for biotechnology information. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em 20 fev. 2006.
- Palmgren, M. G.; Harper, J. F. Pumping with plant P-type ATPase. **Journal of Experimental Botanic**, Oxford, v.50, p.883-893, 1999.
- Palmgren, M. G.; Sommarin, M.; Serrano, R.; Larsson, C. Identification of an Autoinhibitory Domain in the C-terminal Region of the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 266, n.30, p.20470-20475, 1991.
- Paz-Ares, J.; Ghosal, D.; Wienand, U.; Peterson, P.A.; Saedler, H. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 12, p. 3553-3558, 1987.
- Poole, R.J. Solute Transport. In: Taiz, L.; Zeiger, E. **Plant Physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002, cap.6, p.87-108.
- Reymond, P.; Farmer, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion Plant Biology**, London, v.1, n. 5, p.404-411, 1998.
- 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.; Yu, G. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, Washington, v. 290, n. 5499, p.2105-2110, 2000.
- Rushton, P. J.; Somssich, I. E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 1, n. 4, p. 311-315, 1998.
- Saciloto, R.F.Z. Inserção do gene pr5k em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning**, a laboratory manual. 2. ed. New York : Cold Spring Harbour Laboratory, 1989. v.3, p.E 37.
- Schummer, M.; Ng, W.L.; Bumgarner, R.E.; Nelson, P.S.; Schummer, B.; Bednarski, D.W.; Hassell, L.; Baldwin, R.I.; Karlan, B.Y.; Hood,

- L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes over expressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Napoli, v.238, p. 375-385, 1999.
36. Sugar Cane EST Genome Project. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado São Paulo – FAPESP. 2001. Disponível em: <<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br>>. Acesso em: 20 fev. 2006.
37. Tusher, V; Tibshirani, R.; Chu, C. Significance analysis of microarrays applied to ionizing radiation response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, n. 9, p.5116-5121, 2001.
38. União da Agroindústria Canavieira de São Paulo – Unica. 2004. Disponível em: - <<http://www.portalunica.com.br/referencia/estatisticas.jsp>>. Acesso em 03 abr. 2006.
39. Vera-Estrella, R.; Barkla, B.J.; Higgins, V.J.; Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens. Activation of hostplasma-membrane H^+ -ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.209-215, 1994.
40. Vettore, A. L.; da Silva, F. R.; Kemper, E. L.; Arruda, P The libraries that made SUCEST. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 1-7, 2001.
41. Wevwsiep, L.; Rüpping, E.; Knogge, W. Stimulation of barley plas-malemma H^+ -ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*, **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.297-301, 1993.
42. Xing, T.; Higgins, V. J.; Blumwald, E. Identification de G protein mediating fungal elicitor-induced dephosphorilation of host plasma membrane H^+ -ATPase, **Journal Experimental Botanic**, Oxford, v.48, p.229-237, 1997.