

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mRNA
COMPLETO DO GENE *PtSRR1* ISOLADO DO FUNGO
ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius***

RECIFE

2009

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mRNA COMPLETO DO GENE
PtSRR1 ISOLADO DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Dr^a. Elaine Malosso (UFPE)

Co-orientadores:

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ)

Dr^a. Cláudia Elizabete de Lima Lins (UFPE)

RECIFE

2009

Vieira, Helder Elísio Evangelista

Obtenção e caracterização do mRNA completo do gene *PtSRR1* isolado do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* / Helder Elísio e Evangelista Vieira. – Recife: O Autor, 2011.

61 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Elaine Malosso

Co-orientadores: Bartolomeu Acioli dos Santos

Cláudia Elizabete de Lima Lins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Regulação da expressão gênica 2. Fungo I. Título.

572.865

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-207

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO mRNA COMPLETO DO GENE
PtSRR1 ISOLADO DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Defesa em 19 de fevereiro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a. Elaine Malosso - Universidade Federal de Pernambuco (Orientadora)

Dr^a. Vetúria Lopes de Oliveira - Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Cíntia Renata Costa Rocha - Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTE

Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva – CpqAM/ LaVITE-PE

*“E se tudo estiver perdido... ainda assim vale a pena continuar.
Basta pensar no caminho percorrido até aqui”.*

Helder Vieira

OFEREÇO:

Aos meus pais José Vieira de Araújo e Tilda Evangelista Vieira por todo amor e carinho doados incondicionalmente ao longo de minha vida; por me ensinarem o valor da educação como fator de transformação; por me oferecerem a base familiar tão importante na minha formação como ser humano; por tudo que hoje eu sou. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pela acolhida e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelos ensinamentos compartilhados.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Dr^a Leonor Costa Maia pelo apoio e doação de recursos importantes para a execução deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Prof^a.Dr^a. Elaine Malosso pela orientação, pelos ensinamentos de biologia molecular e genética; pela confiança e enorme paciência em esclarecer as minhas dúvidas; por me dar apoio nos momentos de dificuldade ao longo desses dois anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos pela co-orientação e amizade. Por ser exemplo de seriedade e competência, por ser inovador e ousado na busca pelo desenvolvimento científico. Pelos ensinamentos de genética e biologia molecular e por compartilhar a idéia deste projeto confiando no meu potencial em executá-lo.

À Prof^a.Dr^a. Cláudia Lins pelo apoio, colaboração e ensinamentos acerca das ectomicorrizas. Também pela amizade construída ao longo desses anos.

Ao Centro de Pesquisas Ageu Magalhães/Departamento de Virologia e Terapia Experimental (Lavite) na pessoa do Chefe deste departamento, a Prof^a.Dr^a Laura Helena Vega Gonzales Gil por disponibilizar as dependências deste laboratório e permitir a minha estada no desenvolvimento das etapas de biologia molecular. Também a todos os técnicos, funcionários e pesquisadores deste centro de pesquisa, em especial aos amigos André Pastor, Michelle Tâmara, Gerusa Barros, Verônica Gomes, Sabrina Almeida, e Clintiano Curvelo pela ajuda e troca de experiência tão importante na minha formação profissional.

A Unidade de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal (ICAT) da Faculdade de Ciências de Lisboa/Universidade de Lisboa-Portugal, pelo fornecimento e envio do isolado fúngico ectomicorrízico.

Ao CETENE, em especial a Daniela Werner pela parceria no desenvolvimento do sistema *in vitro* de indução ectomicorrízica.

À Profª.Drª. Maria do Socorro por ter me ajudado com o preparo da solução nutritiva de eucalipto.

Ao Departamento de Física pelo fornecimento do N líquido utilizado nas etapas de extração de RNA.

Ao Departamento de Antibióticos e à Profª.Drª. Janete Magali de Araújo por permitir o armazenamento das amostras de RNA.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara pelas análises de bioinformática e contribuições na discussão.

A toda a minha família e em especial aos meus pais, José Vieira de Araújo e Tilda Evangelista Vieira, por estarem sempre ao meu lado, me encorajando nos momentos de dificuldade e angústia.

A todos os meus amigos, àqueles que estão distantes, mas que de alguma forma torceram pela minha felicidade e acompanharam minha trajetória. Não poderia deixar de agradecer aos amigos que já não estão mais “presentes” e que, no entanto, foram tão importantes. Em especial quero agradecer a Ronaldo A. Campos Junior e a Joyelli Moreira por participarem ativamente da minha vida, pela amizade incondicional e sincera; por me estimularem a dar este grande passo.

A todos os colegas da turma de mestrado, em especial aos amigos Clarissa Isabel, Suanni Lemos e Wendell Medrado, pela amizade construída ao longo desses dois anos e que de maneira essencial tornou essa difícil jornada mais prazerosa e possível.

A todos os Laboratórios do Departamento de Micologia, bem como os funcionários, técnicos e colegas; em especial à secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Giovanna Guterres por estar sempre disposta a ajudar, com simplicidade e simpatia.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Muito obrigado!

RESUMO

A simbiose ectomicorrízica resulta da expressão de vários genes cujas seqüências e funções devem ser conhecidas para uma melhor exploração desta simbiose. Utilizando microarranjos de cDNA para observar o padrão de transcrição fúngica nos estágios iniciais da colonização, identificou-se o gene *PtSRR1*, cuja porção 3' foi parcialmente seqüenciada e caracterizada. Esta EST de função desconhecida é similar a uma seqüência do fungo *Pisolithus microcarpus*, obtida aos 21 dias de interação com *Eucalyptus* e depositada no GenBank. O peptídeo putativo traduzido (75 Aa) corresponde a uma molécula de origem fúngica sobreexpressa em baixa disponibilidade de nitrogênio. Este trabalho teve como objetivos a obtenção da ORF mais provável do gene *PtSRR1*, através da técnica RACE 5' e a caracterização *in silico* da proteína codificada por este gene. Para tal, discos de meio cobertos de micélio de *P. tinctorius* foram repicados em meio MNM líquido e após obtenção da biomassa o RNA total foi extraído e submetido à RACE 5'. O maior fragmento (~400 pb) foi selecionado, purificado e clonado. Os produtos de PCR dos clones foram seqüenciados utilizando-se iniciadores específicos para as regiões que flanqueiam o sítio de clonagem. A seqüência consenso obtida pela junção da nova seqüência (porção 5') com a previamente conhecida (porção 3') gerou um novo fragmento de 636 pb. O peptídeo traduzido da ORF mais viável (127 Aa) foi analisado através de ferramentas de bioinformática. A análise estrutural preliminar revelou quatro locais potenciais de alterações pós-traducionais: dois sítios de N-glicosilação e dois sítios de fosforilação, aliados a uma forte probabilidade de que a proteína PtSRR1 seja transmembranar, composta por uma alfa-hélice hidrofóbica e uma região predominantemente hidrofílica com seis fitas-beta intercaladas por *loops*. Dado que o peptídeo não possui domínios conservados clássicos de proteínas previamente caracterizadas e que não há estrutura cristalizada similar depositada em bancos de dados, não foi possível prever a estrutura tridimensional da PtSRR1. Os resultados apontam para a necessidade de estudos adicionais sobre o gene da PtSRR1 como um possível controlador/marcador de desenvolvimento fúngico durante os estágios iniciais da interação ectomicorrízica.

Palavras-chave: Expressão gênica, fungos ectomicorrízicos, genes simbiose-regulados.

ABSTRACT

Ectomycorrhizal symbiosis results from the expression of several genes whose sequences and functions should be known for a better employment of this symbiosis. Using cDNA microarray to observe the pattern of fungal transcription in the early stages of colonization, the *PtSRR1* gene was identified and its 3' portion was partially sequenced and characterized. This EST of unknown function is similar to a *Pisolithus microcarpus* sequence deposited in the GenBank, found after 21 days of interaction with *Eucalyptus*. The putative translated peptide (75 Aa) corresponds to a fungal origin molecule up-regulated under low N availability. This study aimed to obtain the most probable ORF of the *PtSRR1* gene using the RACE 5' technique and to characterize *in silico* the protein coded by the *PtSRR1* gene. Discs of fungal mycelia were subcultured to liquid MNM. After fungal growth, total RNA was extracted and submitted to RACE 5'. The largest fragment (~400 pb) was selected, purified and cloned. PCR products of the clones were sequenced using primers specific to the flanking regions of the cloning site. The new 5' sequence was aligned to the previously known 3' sequence resulting in a new 636 bp consensus fragment. The peptide translated from the most probable ORF (127 Aa) was analysed using bioinformatic tools. The preliminary structural analysis of the PtSRR1 revealed four potential sites of postranslation modification: two N-glycosylation sites and two phosphorylation sites, allied to a strong probability for a transmembrane protein composed of a hydrophobic alpha-helix and a hydrophilic regions consisting of six beta-strands with intercalary loops. Given that the peptide do not show the classical conserved protein domains previously characterized and there is no similar crystallized structure in the databank, it was not possible to preview the tridimensional structure of the PtSRR1. These results point to the need of further studies of the PtSRR1 as a possible controller/marker of the fungal development during the early stages of ectomycorrhizal interaction.

Keywords: Gene expression, ectomycorrhizal fungi, symbiosis-regulated genes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A -adenina	ORF –open reading frame
Aa -aminoácidos	PCR –reação em cadeia da polimerase
AIA –ácido indol acético	pb –pares de base
A230 -absorvância a 230 nm	pH -expoente de íons de hidrogênio
A260 -absorvância a 260 nm	PtSRR1 –gene <i>Pisolithus tinctorius</i>
A280 -absorvância a 280 nm	<i>symbiosis related receptor 1</i>
ATP -adenosina 5'- trifosfato	PtSRR1 –proteína codificada do gene
cm -centímetro	<i>PtSRR1</i>
cDNA -DNA complementar	pM -picomolar
°C -graus Celsius	Poly (A +) -poliadenilado (mRNA)
DEPC -dietilpirocarbonato	RACE -amplificação rápida das
DNA -ácido desoxirribonucleico	extremidades de cDNA
EDTA -ácido etilendiamina tetra- acético	RNA -ácido ribonucleico
EST –expressed sequence tag	RNase -ribonuclease
G –guanina	rpm -rotações por minuto
g -grama	RT -transcriptase reversa
IPTG -isopropil-1-thio-P- D- galactopiranosido	SRAPs –symbiosis related acid proteins
Kg -quilograma	SDS -sulfato de sódio dodecil
kDa -kilodaltons	s -segundos
LB -Luria-Bertani	Taq - <i>Thermus aquaticus</i>
M -molaridade	TAE - Tris-acetato-EDTA
Ma –milhões de anos	t-RNA -ácido ribonucleico de
MCS -sítio de clonagem múltipla	transferencia
mg -miligrama	U -unidades de enzima
Mha –milhões de hectare	UTR –regiões não traduzíveis
min –minuto	UV -ultra-violeta
ml -mililitro	V -volts
mm –milímetro	v/v -volume por volume
MNM – Melin-Norkrans Modificado	W -watt
mM -milimolar	X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indoil-P-D- galactopiranosido
mmol -milimole	µg -micrograma
mRNA -RNA mensageiro	µl -microlitro
NCBI –National Center for biotechnology Information	µM -micromolar
ng -nanograma	
nm -nanômetro	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* X *Pinus pumila* em corte transversal. Nesta figura não se observa o micélio circundante. Legenda: (MF) manto fúngico, (RH) rede de Hartig nos espaços intercelulares do córtex..... 18
- Figura 2.** Crescimento de *Eucalyptus grandis* inoculado com diferentes isolados de *Pisolithus* spp. (M5, 35, PT 90A). C = controle, sem inoculação..... 19
- Figura 3.** Estágios do desenvolvimento *in vitro* de ectomicorriza formada pela associação de *P. involutus* com *B. pendula*, entre 0 e 21 dias de interação. As setas à esquerda indicam as extremidades radiculares da plântula sendo cobertas pelo micélio, no início da formação do manto (0-4 dias) e surgimento de radículas laterais (4-21 dias). À direita, observam-se (4º dia) duas camadas do manto diferenciado (setas com duas cabeças) e penetração das hifas no córtex intercelular (setas simples). Aos oito dias, observa-se o início da formação da rede de Hartig. Aos 14 dias, vê-se a rede de Hartig plenamente desenvolvida. Aos 21 dias, uma extensa ramificação do micélio no interior do córtex radicular..... 24
- Figura 4.** O gene *PtSRR1*. Seqüência completa de nucleotídeos (636 pb) e sua provável ORF (Os códons com seus 127 aminoácidos correspondentes). O códon de terminação está representado pela palavra “End”. A ORF representa a maior região de tradução para a seqüência. Linha contínua =fragmento novo obtido via RACE 5’; Linha tracejada = fragmento pré-existente; ← = 5’ UTR; → = 3’ UTR. □ = indica a seqüência Kozak com variações e respectivas posições das bases..... 40
- Figura 5.** Predição da estrutura secundária e domínio transmembrânico de *PTSRR1*. Legenda: AA=seqüência de aminoácidos, *PHD_htm*=predição de Hélices transmembrânicas (M=hélice transmembrânica, espaços em branco=regiões não membranares), *Rel_htm*=índice de confiabilidade da predição *PHD_htm* (Predições confiáveis estão marcadas por '*'), *PROF_sec*=predição da estrutura secundária (H=Hélice, E=fita/folha, branco: “loop”), *Rel_sec*=índice de confiabilidade da predição *PROF_sec* (0=baixo até 9=alto), *SUB_sec*=subconjunto de todas as predições *PROF_sec*, para todos os resíduos com uma meia de exatidão > 82% (L= “loop”, “.”=sem predição para o resíduo), *O_3_acc*=acessibilidade relativa ao solvente observada (b=0-9%, i=9-36%, e=36-100%). *P_3_acc*=acessibilidade relativa ao solvente predita, *Rel_acc*: índice de confiabilidade da predição de *P_3_acc*, *SUB_acc*:subconjunto da predição de *P_3_acc*, para todos os resíduos com uma correlação média > 0.69. Sítios de glicosilação NFSQ e NFTI = (-); sítios de fosforilação TNSE e TVPD = (□)..... 41
- Figura 6.** Análise de hidrofobicidade da proteína putativa *PtSRR1*. Observa-se uma região inicial de forte natureza hidrofóbica (Escala pelo método Kyte e Doolittle)..... 42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 AS MICORRIZAS.....	16
2.2 AS ECTOMICORRIZAS.....	17
2.3 IMPORTÂNCIA DAS ECTOMICORRIZAS.....	21
2.4 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS ECTOMICORRIZAS.....	22
2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM AS ECTOMICORRIZAS.....	25
2.6 ASPECTOS MOLECULARES DA ECTOMICORRIZAÇÃO.....	26
2.7 GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SIMBIOSE.....	29
3 O GENE <i>PtSRR1</i>, UM POTENCIAL CONTROLADOR DA FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS	33
3.1 INTRODUÇÃO	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.2.1 Material biológico e condições de cultivo.....	35
3.2.2 Extração de RNA.....	35
3.2.3 Análise qualitativa e quantificação de RNA.....	36
3.2.4 Obtenção da ORF do gene <i>PtSRR1</i> via RACE – 5'.....	37
3.2.5 Clonagem do gene <i>PtSRR1</i>	37
3.2.6 Confirmação da obtenção do gene <i>PtSRR1</i>	38
3.2.7 Análise das seqüências.....	39
3.3 RESULTADOS	39
3.3.1 O gene <i>PtSRR1</i>	39

3.3.2 Análise estrutural da proteína PtSRR1.....	40
3.4 DISCUSSÃO.....	42
4 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Existem inúmeros exemplos de interação entre microrganismos e plantas terrestres que proporcionam maior adaptabilidade de ambos às condições do meio ambiente. As micorrizas (do grego: *mykes* = fungo; *rhiza* = raiz) são um exemplo bem conhecido desse tipo de interação que ocorre entre fungos do solo e vegetais. Essa interação é benéfica para ambos os organismos, já que o fungo disponibiliza para a planta os nutrientes essenciais, proporcionando maior crescimento e melhor nutrição, e se beneficia com os carboidratos fotossintetizados por ela. Em alguns casos, a micorriza funciona como uma barreira protetora para o hospedeiro, impedindo a ação de patógenos de raiz, além de conferir tolerância a fatores abióticos como os baixos teores de água no solo (SMITH & READ, 1997).

Smith & Read (1997), baseados em características morfológicas do fungo, no tipo de estrutura micorrízica formada e nos parceiros envolvidos na simbiose sugerem a formação de sete tipos de micorriza. Dentre elas, as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas são as mais comumente encontradas. Ao contrário dos fungos micorrízicos arbusculares, que penetram inter e intracelularmente na raiz do hospedeiro, os fungos ectomicorrízicos ocupam apenas os espaços intercelulares do córtex.

As ectomicorrizas ocorrem em cerca de 90 % das árvores em regiões de clima temperado. Nos países de clima tropical, como o Brasil, os fungos ectomicorrízicos podem associar-se a plantas das famílias Caesalpiniaceae (*Tamarindus* spp.), Dipterocarpaceae (*Dipterocarpus* spp.), Fagaceae (*Quercus* spp.), Pinaceae (*Pinus* spp.) e Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.).

O processo de formação de uma ectomicorriza é bastante complexo e exige várias modificações morfofisiológicas nos parceiros, culminando na formação de novas estruturas características da simbiose (LE QUÉREÉ et al., 2005). Para que tal simbiose exista é preciso que os participantes se reconheçam e efetuem as trocas nutricionais, sem a ativação do mecanismo de defesa vegetal (MARTIN et al., 2001).

Os fungos ectomicorrízicos variam em compatibilidade e eficiência em relação ao seu hospedeiro. Isso se deve, em parte, à capacidade de infectividade do fungo que pode apresentar diferenças, dependendo da espécie arbórea envolvida e das condições ambientais a que for submetido (GARBAYE, 1990; LEI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1994; SMITH & READ, 1997).

Diferentes espécies do gênero *Pisolithus* são comumente utilizadas em pesquisas que visam o entendimento dos mecanismos de sinalização molecular e de desenvolvimento da simbiose, como o *Pisolithus tinctorius*, isolado a partir do corpo de frutificação formado em associação com *Eucalyptus citriodora* em ambientes naturais (DITENGOU & LAPEYRIE, 2000).

Sabe-se que a sinalização entre os parceiros da simbiose ectomicorrízica é realizada pelo reconhecimento de moléculas específicas sintetizadas por ambos os parceiros (MARTIN et al., 2001; TAGU et al., 2002b). Estudos baseados na bioquímica, biologia molecular e genética indicam que a expressão diferenciada de genes, resultando na síntese diferenciada de proteínas e de algumas enzimas, é essencial nos estágios iniciais do desenvolvimento da micorriza (BARKER et al., 1998; BONFANTE-FASOLO & SPANU, 1994). Estas observações fomentaram a sugestão de Hilbert et al. (1991) que relataram o surgimento de novas cadeias polipeptídicas durante a colonização ectomicorrízica. Estes polipeptídeos, quando identificados, são denominados de ectomicorrizinas. Desde a descoberta das ectomicorrizinas, muitas proteínas começaram a despertar o interesse de pesquisadores de várias partes do mundo, dado sua provável participação no desenvolvimento da simbiose. Duas classes de proteínas mais comumente citadas como importantes no processo de formação de ectomicorriza são as hidrofobinas e as SRAPS (*symbiosis regulated acid proteins*), encontradas em vários sistemas ectomicorrízicos (TAGU et al., 1996; LAURENT et al., 1999; VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005).

Trabalhos recentes, com foco na identificação de genes expressos diferencialmente, utilizam técnicas moleculares poderosas, como os macro e microarranjos de cDNA (DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005), que permitem a observação simultânea de centenas ou milhares de genes expressos diferencialmente em ectomicorrizas. Esses estudos têm contribuído para a elaboração de teorias e a elucidação preliminar das vias de sinalização utilizadas pelos fungos durante as diferentes fases da colonização (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005). Recentemente, com o emprego de microarranjos de cDNA para a observação do padrão de transcrição fúngica no sistema *Pisolithus tinctorius* - *Castanea sativa*, evidenciou-se a participação de vários genes com funções desconhecidas (ACIOLI-SANTOS et al., 2008a). Um desses genes, por apresentar similaridade com seqüências de origem fúngica e ser sobreexpresso em baixas concentrações de N, foi

parcialmente caracterizado e batizado de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor 1 (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b).

A melhor caracterização do *PtSRR1* e de sua proteína putativa, através da construção do gene completo e análises feitas com técnicas bioinformacionais, constituem um passo significativo para o entendimento da função potencial deste gene no mecanismo de formação/desenvolvimento e controle da simbiose. Tal feito poderá influenciar diretamente na utilização mais racional das ectomicorrizas quando empregadas nas diversas atividades econômicas.

Os objetivos desse trabalho foram: (1) obter e caracterizar o mRNA completo do gene *PtSRR1* e (2) analisar a ORF putativa utilizando ferramentas da bioinformática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS MICORRIZAS

As micorrizas podem ser consideradas como um sistema complexo formado por fungos e plantas, no qual, parte do genoma de ambos é ativada sob a influência do ambiente, na regência da simbiose (SMITH & READ, 1997). O termo “micorriza” foi inicialmente empregado em 1885, pelo botânico alemão Albert Bernard Frank para a descrição de um “órgão independente” formado pela associação entre o micélio e as raízes de plantas. O mesmo autor, em 1894, também especulou sobre a retenção da habilidade saprofítica ancestral de alguns basidiomicetos ectomicorrízicos, além de demonstrar que o micélio abundante na rizosfera ajudava a absorver nutrientes do solo sem causar danos à planta hospedeira (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Smith & Read (1997) sugerem a existência de sete tipos de micorrizas, com base em características tais como tipo da hifa, padrão de colonização da raiz, presença da rede de Hartig, táxon do fungo e táxon da planta (Briófita, Pteridófitas, Gimnospermas e Angiospermas). Os sete tipos são: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutóide, monotrópide, ericóide e orquidóides, sendo as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas as mais comumente encontradas (BELLEI & CARVALHO, 1992).

Acredita-se que este tipo de associação tenha surgido há cerca de 400 milhões de anos quando a vida vegetal do planeta dava os primeiros passos rumo ao ambiente terrestre. Há indícios de que essa interação tenha acontecido a partir de uma condição micorrízica arbuscular ancestral (CAIRNEY, 2000; BRUNDRETT, 2002). Segundo Schüßler et al. (2001), existem quatro hipóteses para explicar o surgimento e a formação das micorrizas ao longo do tempo. A primeira propõe que a co-evolução de plantas e fungos micorrízicos arbusculares teria se iniciado em ambiente aquático. A segunda hipótese afirma que a associação teria ocorrido após a entrada das plantas no ambiente terrestre. A terceira sugere que, antes mesmo de existirem os fungos micorrízicos arbusculares, outros fungos de hábito parasita ou saprófito seriam os responsáveis pelo surgimento da simbiose após o estabelecimento das plantas na terra. Por fim, a quarta hipótese diz que a interação “fungos – plantas colonizadoras do ambiente terrestre” teria se tornado mais complexa com o passar dos anos a partir de simbioses mais primitivas pré-existentes.

De um modo geral, a micorriza funcional oferece aos simbiossiontes uma série de benefícios. O fungo estabelece associação mutualística com as raízes das plantas vasculares (SMITH & READ, 1997) e, ao colonizar o sistema radicular, se ramifica pelo solo ampliando a área de absorção de nutrientes essenciais à planta como o fósforo, zinco, manganês e cobre, entre outros. Em contrapartida, o fungo se beneficia recebendo carboidratos fotossintetizados pela planta (EZAWA et al., 2002; BAGO et al., 2002; CHALOT et al., 2002; SOUZA et al., 2006). Adicionalmente, a planta passa a responder melhor a variações bruscas de pH do solo (SIQUEIRA & FRANCO, 1988), apresenta maior tolerância a compostos tóxicos de difícil metabolização como os metais pesados (BRUNNER & FREY, 2000), além de estar mais protegida contra o ataque de possíveis agentes fitopatogênicos (MARX, 1972; CORDIER et al., 1998). Além disso, o micobionte encontra na planta um compartimento interno de proteção (BELLEI & CARVALHO, 1992). Sendo assim, essa interação simbiótica mutualista é importante na determinação do modo como as plantas e os fungos sobrevivem e se adaptam ao tempo/ambiente, em condições adversas (SMITH & READ, 1997).

2.2 AS ECTOMICORRIZAS

As ectomicorrizas (do grego “ektós” que significa externo) são um tipo particular de micorriza na qual o fungo coloniza externamente as raízes e os espaços intercelulares do córtex da planta (SMITH & READ, 1997). Neste tipo de associação, não há a formação de estruturas (como os arbúsculos das micorrizas arbusculares) no interior das células do hospedeiro (BELLEI & CARVALHO, 1992).

Um dos primeiros registros fósseis de ectomicorriza data de 50 Ma (Eoceno) e, embora não seja possível indicar a data precisa de seu surgimento, acredita-se que a associação tenha aparecido a 200 Ma, juntamente com o surgimento dos basidiomicetos ressupinados (CAIRNEY, 2000).

As três estruturas mais facilmente encontradas em ectomicorrizas são: o manto, a rede de Hartig e o micélio circundante. O manto (**Figura 1**) é formado por uma massa de hifas que recobre externamente a raiz hospedeira, podendo variar em relação a sua estrutura organizacional, cor e espessura (BELLEI & CARVALHO, 1992; SMITH & READ, 1997), ou até formar um falso tecido parenquimatoso, influenciando diretamente a absorção de água e de nutrientes e a proteção contra patógenos (PETERSON & BONFANTE, 1994; SMITH & READ, 1997).

A rede de Hartig (**Figura 1**), estrutura onde ocorrem as trocas metabólicas entre os simbios (TAGU et al., 2002a), é formada pela invasão dos espaços intercelulares do córtex pelas hifas, sem atingir a endoderme do vegetal (BELLEI & CARVALHO, 1992; SMITH & READ, 1997). No citoplasma das hifas da rede de Hartig, que ficam adjacentes às células corticais, é constatada a presença de vários núcleos, retículo endoplasmático e mitocôndrias polimórficas, indicando uma ativa e compatível associação ectomicorrízica (GROSS et al., 2004).

Por último, o denso micélio circundante faz a ligação entre ectomicorriza/solo/basidiocarpos (BELLEI & CARVALHO, 1992; SMITH & READ, 1997) permitindo uma maior captação de água (AUGÉ, 2001). Isso se dá devido ao aumento da região explorada pelo crescimento das hifas ou rizomorfos, comparada à abrangência das raízes (DUDDRIDGE et al., 1980; THOMSON et al., 1994), proporcionando maior troca de nutrientes orgânicos e inorgânicos entre os organismos (BELLEI & CARVALHO, 1992; SMITH & READ, 1997).

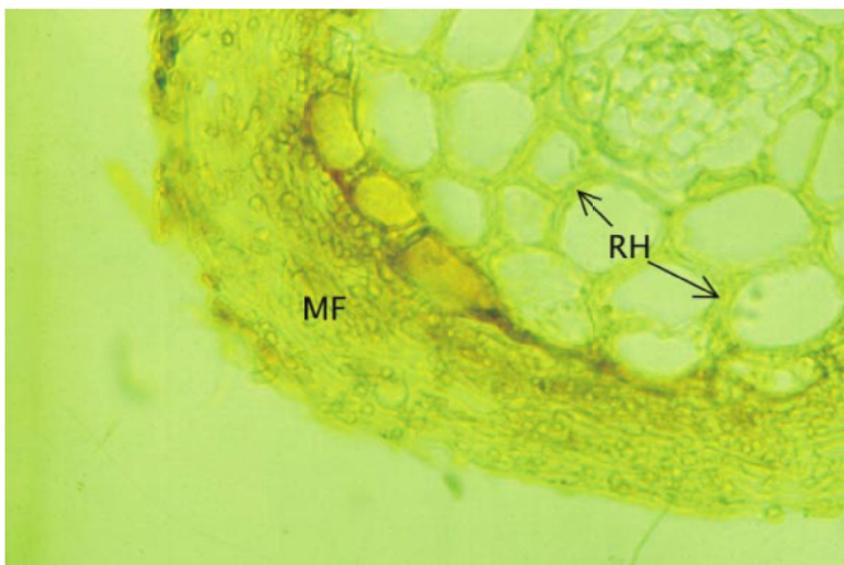


Figura 1. Ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* - *Pinus pumila* em corte transversal. Nesta figura não se observa o micélio circundante. Legenda: (MF) manto fúngico, (RH) rede de Hartig nos espaços intercelulares do córtex (COSTA et al., 2002).

Apesar de ocorrerem em apenas 10 % das espécies vasculares, as ectomicorrizas são encontradas em 90% das árvores de clima temperado (WILCOX, 1990), predominando em plantas de interesse silvicultural, como as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* (OLIVEIRA et al., 2008). Porém, os fungos ectomicorrízicos apresentam certa especificidade com relação ao hospedeiro e diferem quanto à capacidade de colonização e

os benefícios conferidos às plantas (MARX & CORDELL, 1989). Estudos de seleção de isolados de fungos ectomicorrízicos fazem-se necessários para identificar os simbiossiontes compatíveis com determinada espécie vegetal e condições ambientais, tendo como finalidade o aumento da sobrevivência das mudas e, conseqüentemente, maior produtividade das plantações (GARBAYE, 1984; ROSSI et al., 2002).

Assim, a associação resulta em boas taxas de crescimento para os vegetais, fazendo com que atinjam um estágio máximo de desenvolvimento em menor tempo. Os efeitos positivos que a associação micorrízica traz para as plantas encontram-se amplamente documentados na literatura científica (MARX et al., 1989, 1991; MELLO et al., 2006). Costa et al. (2002) demonstraram que as mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* spp. apresentaram maiores taxas de crescimento em comparação com o controle. A pesquisa também revelou que a taxa de crescimento das plantas variou de acordo com os micobiontes testados (**Figura 2**)

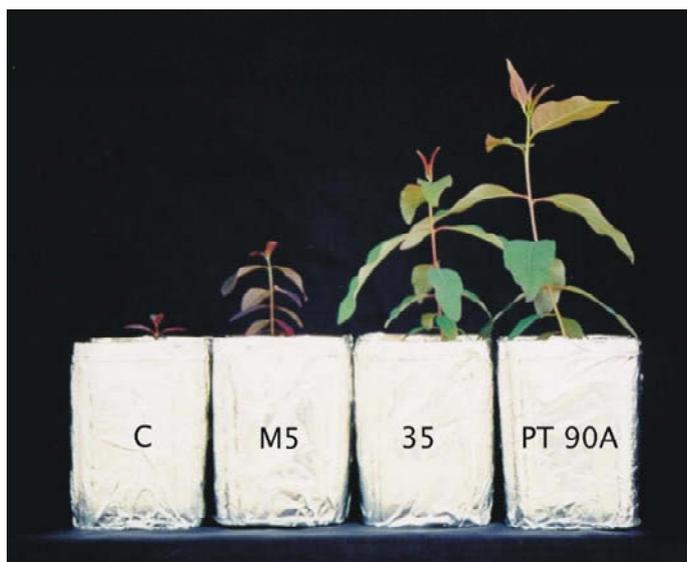


Figura 2. Crescimento de *Eucalyptus grandis* inoculado com diferentes isolados de *Pisolithus* spp. (M5, 35, PT 90A). C = controle, sem inoculação (COSTA et al., 2002).

As espécies vegetais quando ectomicorrizadas utilizam, de forma mais eficiente, certos nutrientes presentes no solo. Embora isso não seja uma regra, dadas as condições de disponibilidade desses nutrientes e o tipo de substrato a que estão submetidas, há um menor acúmulo de cátions (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Na^+) e maior de ânions (SO_4^{-2} , PO_4^{-3} , NO_3^- e Cl^-) nos tecidos do hospedeiro (BLEDSOE & RYGIWICZ, 1986; MARSCHNER & DELL, 1994). O modo como os nutrientes do solo são transportados até o parceiro vegetal pode ser resumido como a seguir: primeiramente os nutrientes minerais são

absorvidos pelo micélio e armazenados no manto. Em seguida, parte do P e N que foi armazenada é convertida em polifosfatos e aminoácidos e segue para a rede de Hartig, passando para as células do córtex da raiz até atingir o xilema e as demais partes da planta. Essa transferência implica em custo para a planta, já que a mesma transfere para o fungo hidratos de carbono equivalentes a 40% do que foi produzido ao fim do processo fotossintético (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). De um modo geral a absorção de P e de outros nutrientes é mais eficiente nas ectomicorrizas, devido ao fato de esses fungos produzirem fosfatases (TIBBETT et al., 1998) e proteases (NEHLS et al., 2001). Essas enzimas têm a função de solubilizar estes componentes do solo tornando-os disponíveis para a planta (LAPEYRIE et al., 1991; LANDERWEERT et al., 2001) e contribuindo para a ciclagem desses elementos no ambiente.

Estima-se que existam mais de 6.000 espécies de fungos ectomicorrízicos com representantes nos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (SMITH & READ, 1997). Os dois primeiros filos citados são os mais importantes, pois contém a maior parte dos fungos ectomicorrízicos, com pelo menos 15 famílias com espécies micorrízicas. Dentre os fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota, as famílias Amanitaceae, Boletaceae e Russulaceae são aquelas de onde a maioria dos fungos ectomicorrízicos é originária (HORTON & BRUNS, 2001; BRUNDRETT, 2002). Nestas e em outras famílias, as espécies micorrízicas de *Pisolithus* e *Scleroderma* (Sclerodermataceae), *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Thelephora* (Thelephoraceae) e *Ramaria* (Ramariaceae) colonizam, principalmente, árvores de *Pinus* e *Eucalyptus* (GIACHINI et al., 2000; 2004).

São reconhecidamente ectomicorrízicas, cerca de 35 famílias botânicas angiospérmicas e gimnospérmicas em que pelo menos um indivíduo foi analisado e caracterizado como formador da simbiose (SMITH & READ, 1997). Em meio a todas as espécies, dois hospedeiros ectomicorrízicos têm se destacado: *Pinus* e *Eucalyptus*. Isso porque esses vegetais vêm sendo utilizados na construção de sistemas experimentais para estudos de fisiologia e bioquímica em ectomicorrizas, além de estarem entre as plantas mais exploradas em silvicultura (DUDDRIDGE & READ, 1984; LAPEYRIE et al., 1990; BARKER et al., 2002).

Mesmo sabendo que essas espécies vegetais são favorecidas na associação, existe uma variação no que se refere à infectividade e eficiência das espécies fúngicas para a micorrização (ALVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1994). Essa variação é explicada pela especificidade entre o fungo e o hospedeiro, detectada como um fator

determinante na simbiose. A especificidade pode acontecer entre gêneros ou até mesmo espécies (MOLINA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1994). Estudos têm sido feitos a fim de comprovar a sua eficiência através do desenvolvimento de sistemas de interação *in vitro*, que buscam a obtenção de modelos de estudo. Em especial, estão os sistemas que utilizam plantas de *Eucalyptus* e fungos do gênero *Pisolithus* (LEI et al., 1990; MARTIN et al., 2001; CAIRNEY, 2002; PETER et al., 2003).

2.3 IMPORTÂNCIA DAS ECTOMICORRIZAS

Pela sua natureza de simbiose mutualista, as ectomicorrizas são de grande importância ecológica e econômica sob vários aspectos (SMITH & READ, 1997; BRUNNER, 2001). Elas atuam diretamente na composição dos solos participando da ciclagem global de nutrientes (SMITH & READ, 1997). Isso porque os fungos ectomicorrízicos são comuns em solos ricos em matéria orgânica e, além de estabelecer a simbiose, podem transformar certas substâncias tornando-as disponíveis para as plantas (CAIRNEY, 2000).

Pesquisas recentes sugerem que fungos ectomicorrízicos conseguem mobilizar certos nutrientes essenciais às plantas diretamente de minerais através da excreção de ácidos orgânicos, afetando a ciclagem destes compostos em sistemas florestais (LANDEWEERT et al., 2001). Além disso, a micorriza pode aumentar a tolerância do vegetal quando este é submetido a solos de composição ácida ou com alta toxidez, ou ainda, elevar a viabilidade das árvores frente ao impacto da ação eutrofisadora em solos florestais (BRUNNER, 2001).

Os dados levantados em um trabalho de revisão sobre a interação entre espécies do gênero *Pisolithus* na formação de ectomicorrizas com *Eucalyptus* em que evidencia o potencial de reabilitação das plantas ectomicorrizadas em solos degradados, apontaram o fungo *Pisolithus tinctorius* como aquele que mais se adaptou à situação de reflorestamento em áreas sujeitas a estresse edáfico (CAIRNEY & CHAMBERS, 1997). No Brasil, espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* são bastante utilizados em programas de reflorestamento (LIMA, 1993; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1994). Sua introdução no Brasil se deu no início do século XX em decorrência da demanda de matérias primas como madeira (LIMA, 1993). Atualmente há mais de 4.6 Mha plantados com espécies provenientes desses gêneros (GIACHINI et al., 2000). Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (1997), haverá um déficit

mundial de madeira até o ano de 2010. Essa projeção faz crescer o interesse por novas tecnologias que propiciem um aumento na produtividade dessa matéria prima.

O Brasil responde por 31% da produção de celulose de fibra de eucalipto, o equivalente a 22 milhões de toneladas por ano. Para 2010, estima-se que a capacidade anual chegue a 8,2 milhões de toneladas de um total global próximo a 27 milhões (MERCADANTE & CAPO, 2006 *apud* MAGATON et al., 2008).

Ademais do mercado da madeira, não se pode esquecer que o carpóforo de algumas espécies de fungos ectomicorrízicos é bastante apreciado pela indústria alimentícia devido ao seu alto valor de comercialização. A exemplo disso têm-se as espécies *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tricholoma matsutake*, *Boletus edulis*, *Amanita caesarea* (YUN & HALL, 2004) com mercado mundial total mensurado em milhões de dólares (HALL et al., 2003).

2.4 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS ECTOMICORRIZAS

Durante o processo de formação e desenvolvimento as ectomicorrizas exibem modificações fisiológicas e anatômicas (LE QUÉRÉ et al., 2005). Acredita-se que muitas destas transformações sejam o resultado das interações ocorridas entre os simbiontes pela síntese de várias substâncias (auxinas, citoquininas, giberelinas e vitaminas) (MILLER, 1971; CRAFT & MILLER, 1974; SLANKIS, 1974; BARROSO et al., 1986).

Para que tal simbiose tenha o sucesso e a estabilidade funcional necessária, deverá haver uma comunicação entre o fungo e a planta (TAGU et al., 2002a) iniciada muito antes da formação das estruturas típicas (manto, rede de Hartig, etc), sendo a produção de moléculas sinalizadoras a primeira etapa de desenvolvimento. Isso porque, sob a influência de tais moléculas os propágulos do fungo são estimulados a germinar (LAGRANGE et al., 2001), tal como acontece com o hospedeiro vegetal sob o estímulo fúngico (DITENGOU et al., 2003). Esse desenvolvimento resulta de uma cascata de eventos perfeitamente sincronizados e da coordenação entre os genomas dos dois parceiros (MARTIN & HILBERT, 1991; MARTIN & TAGU, 1999), desencadeando o processo de ontogênese das ectomicorrizas.

Inicialmente, a hifa produzida a partir da germinação de propágulos do solo, ou até mesmo do micélio de uma micorriza pré-existente, penetra no córtex radicular, onde

crece e se ramifica (CHILVERS, 1968; FEUGEY et al., 1999). A germinação do propágulo fúngico pode ser influenciada pelas condições da rizosfera (zona de depleção para N e enriquecida para C), servindo de estímulo trófico para o crescimento da hifa em direção à raiz (TAGU et al., 2002a). Há relatos de que as adesinas formam uma densa rede fibrilar rica em glicoproteínas que preenche o espaço entre os parceiros, sendo secretada em forma de fibras orientadas juntamente com mucilagem polissacarídica, liderando o processo de contato entre o fungo e a planta. Este conjunto, juntamente com os receptores do hospedeiro, é importante para o contato entre os simbioses (MARTIN et al., 1999). Tal processo é semelhante às infecções fitopatogênicas. As hifas crescem, aumentam de volume e se ramificam aderindo à raiz da planta na presença ou ausência de pêlos radiculares (BARKER et al., 1998).

Momentos após ocorrer a pré-infecção e o fungo aderir às células da epiderme do vegetal, ocorre a multiplicação das hifas em camadas, que após alguns dias, formarão a estrutura conhecida como manto (HORAN et al., 1988). Este, por sua vez, poderá apresentar diferenças tanto na morfologia como na cor, extensão etc., variando de acordo com os organismos envolvidos na associação (SMITH & READ, 1997).

A planta também sofre a influência do fungo que a estimula a formar as raízes laterais (dicotomia), havendo a eliminação dos pêlos radiculares ou mudanças na estrutura do citoesqueleto (MARTIN et al., 2001). Para o vegetal, o citoesqueleto é importante na divisão celular, citocinese, formação da parede celular e alongação. No fungo, o citoesqueleto tem participação na morfogênese e no crescimento das hifas (TIMONEN & PETERSON, 2002).

O desenvolvimento da ectomicorriza formada pelo fungo *Paxillus involutus* e a planta *Betula pendula*, foi observado por Le Quéré et al. (2005). Esses autores documentaram, com uma série temporal de fotografias em escalas macro e microscópica, as etapas de desenvolvimento e formação da simbiose. Tal processo vai desde o contato inicial do fungo com as raízes hospedeiras (pré-infecção), até o completo estabelecimento da rede de Hartig. Na **Figura 3**, a comparação das ilustrações macroscópicas (coluna à esquerda) com as microscópicas (coluna à direita) permite a confirmação de que essas plantas, após 21 dias de contato com o micobionte, já desenvolveram uma micorriza funcional, pelo menos do ponto de vista morfológico. Ao final do processo de diferenciação, com a formação das estruturas típicas (manto, rede de Hartig e micélio circundante), e havendo as trocas nutricionais entre os simbioses, tem-se uma simbiose ativa e plenamente estabelecida (LE QUÉRÉ et al., 2005).

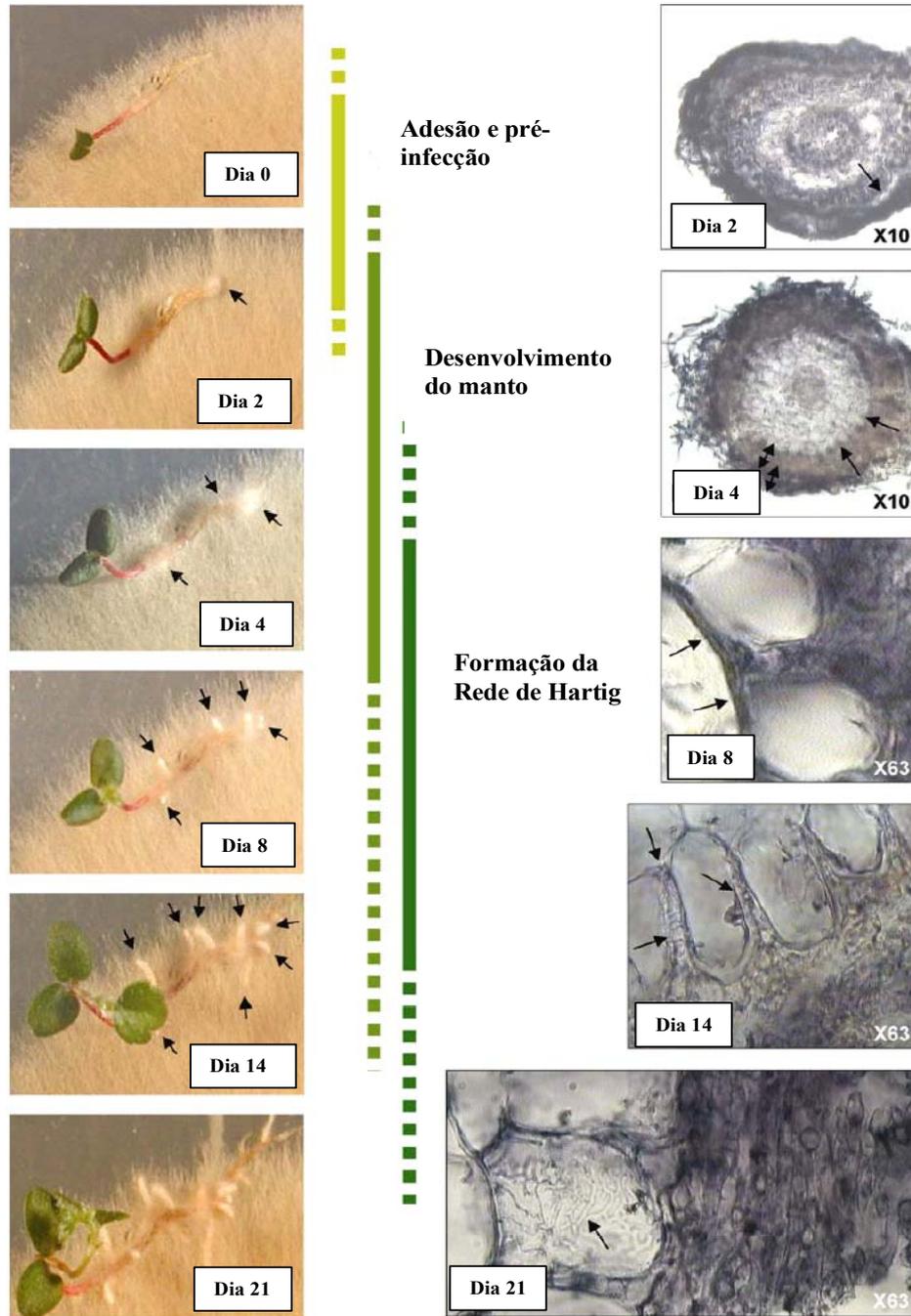


Figura 3. Estágios do desenvolvimento *in vitro* de ectomicorriza formada pela associação de *P. involutus* com *B. pendula*, entre 0 e 21 dias de interação. As setas à esquerda indicam as extremidades radiculares da plântula sendo cobertas pelo micélio, no início da formação do manto (0-4 dias) e surgimento de radículas laterais (4-21 dias). À direita, observam-se (4º dia) duas camadas do manto diferenciado (setas com duas cabeças) e penetração das hifas entre as células do córtex do hospedeiro (setas simples). Aos oito dias, observa-se o início da formação da rede de Hartig. Aos 14 dias, vê-se a rede de Hartig plenamente desenvolvida. Aos 21 dias, uma extensa ramificação do micélio nos espaços intercelulares do córtex radicular. (LE QUÉRÉ et al., 2005).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM AS ECTOMICORRIZAS

O desenvolvimento da associação ectomicorrízica se inicia com alterações no metabolismo dos parceiros, culminado em modificações morfofisiológicas com a formação de compartimentos e estruturas específicas (PETERSON & BONFANTE, 1994; LE QUÉRÉ et al., 2005) que proporcionam a troca de nutrientes entre eles. Para que ocorra a colonização das raízes pela hifa é essencial que haja uma comunicação coordenada entre o fungo e a planta (MARTIN & TAGU, 1999; MARTIN et al., 2001).

Os exsudatos lançados na rizosfera exercem importante influência no desenvolvimento micorrízico, pois podem estimular a germinação dos esporos dos fungos ectomicorrízicos, além de afetar diretamente o solo e a microbiota (SMITH & READ, 1997).

No solo, os macronutrientes como o P e o N são os que mais influenciam a colonização micorrízica. O P, se disponibilizado em grande quantidade, pode reduzir a colonização das raízes e diminuir a esporulação da micota presente. Em estudos com mudas de *Pinus* spp. bem nutridas com N e P, observou-se que a translocação de sacarose para as raízes era menor, limitando o crescimento dos fungos ectomicorrízicos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Outro fator que influencia o desenvolvimento das ectomicorrizas é a síntese de certos hormônios, tanto pelo vegetal como pelo fungo. Dentre os hormônios encontrados nas ectomicorrizas estão as auxinas, citoquininas e giberelinas (WULLSCHLEGERH & REID, 1990; DITENGOU & LAPEYRIE, 2000). As auxinas podem ser encontradas, principalmente, nas gemas apicais e caules jovens das plantas, onde se mantêm os suprimentos nutricionais para as regiões de crescimento (RAVEN et al., 2001). Entre as substâncias denominadas auxinas, a mais comum é o ácido indol acético (AIA) que provoca o desenvolvimento do vegetal (TANG & LOO, 1940) através do alongamento e, conseqüentemente, o crescimento da planta (DITENGOU et al., 2003). No entanto, sabe-se que esse efeito pode variar dependendo do local de atuação e da concentração deste hormônio no vegetal (BARKER & TAGU, 2000; NIEMI et al., 2002).

Há relatos de que os fungos também são produtores das auxinas (EK et al., 1983; GAY & DEBAUD, 1987) e o papel dessas moléculas nas ectomicorrizas seria de modulação de algumas etapas do desenvolvimento da simbiose (GEA et al., 1994). Seu efeito no organismo poderia ser modulado através da interação com substâncias

reguladoras da planta e/ou do fungo como a hipaforina, hormônio que se mostrou eficaz em neutralizar a atividade do AIA no alongamento do eucalipto, sem afetar a atividade de seus análogos (DITENGOU & LAPEYRIE, 2000). A atuação das auxinas vai além das modificações na anatomia das raízes; elas também estão envolvidas na conversão do amido em carboidratos importantes na fisiologia da simbiose ectomicorriza (BELLEI & CARVALHO, 1992).

Outro hormônio sintetizado por fungos ectomicorrízicos é a citoquinina, que pode influenciar diretamente o desenvolvimento da simbiose (NG et al., 1982). As citoquininas são sintetizadas por diversos fungos ectomicorrízicos (WULLSCHLEGERH & REID, 1990) e a sua função está relacionada com o retardamento do processo de maturação e suberização das raízes; o que proporciona à ectomicorriza uma maior sobrevivência e influencia a mobilização de nutrientes (NG et al., 1982).

As giberelinas são encontradas nas plantas, principalmente nos tecidos jovens do sistema caulinar e sementes em desenvolvimento (RAVEN et al., 2001). Elas estimulam a divisão e o alongamento celular, fazendo com que a radícula rompa o tegumento da semente promovendo a sua germinação (TAIZ & ZEIGER, 2006). As giberelinas foram identificadas em fungos ectomicorrízicos em cultura pura. Nas ectomicorrizas, este fitormônio pode ser intercambiado entre a planta hospedeira e o fungo (MILLER, 1971; CRAFT & MILLER, 1974; SLANKIS, 1974; BARROSO et al., 1986), embora sua verdadeira função não esteja totalmente definida.

2.6 ASPECTOS MOLECULARES DA ECTOMICORRIZAÇÃO

O desenvolvimento da associação ectomicorrízica se inicia com a germinação de um esporo viável, ou com a propagação de hifas no solo, seguida do encontro com o sistema radicular do hospedeiro, dando início às transformações morfológicas essenciais para a estruturação da simbiose (SMITH & READ, 1997). Embora estes acontecimentos sejam reconhecidos e bastante documentados na literatura científica, do ponto de vista da morfologia ectomicorrízica, os micorrizologistas buscam atualmente a compreensão dos eventos que levam à associação entre fungo e planta (CARVALHO, 1996). Estes eventos começaram a ser estudados há pouco mais de 10 anos e, embora os conhecimentos sobre o mecanismo de formação da simbiose não esteja completo, sabe-

se que as etapas que levam a essa interação são extremamente complexas e requerem a expressão diferenciada de inúmeros genes regulados pela associação (VOIBLET et al., 2001; LE QUÉREÉ et al., 2005; MARTIN et al., 2008).

Estudos anteriores indicam que para o desenvolvimento dos estágios iniciais da simbiose, é necessária a expressão de genes (NEHLS et al., 1999; POLIDORI et al., 2002), síntese de proteínas e a ativação de algumas enzimas (BARKER et al., 1998). Acredita-se que na etapa de sinalização ocorra a síntese e o reconhecimento de proteínas específicas da simbiose (HILBERT et al., 1991; BURGESS et al., 1995; MARTIN et al., 2001; TAGU et al., 2002b).

Essas hipóteses foram inicialmente sustentadas por Hilbert et al. (1991) que atentaram para o aparecimento de novas cadeias polipeptídicas identificadas durante o processo da ectomicorrização, sendo, desde então, denominadas de ectomicorrizinas. Em 1992, Guttenberger e Hampp sugeriram que as ectomicorrizinas poderiam ser um artefato do método utilizado para a obtenção da simbiose *in vitro*. Fatores como a diferença na composição do meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo e a idade do tecido da planta, além do método inadequado para a extração de proteínas, poderia levar a um resultado falso positivo na complexa sucessão de eventos que é o estabelecimento da micorriza.

Martin et al. (2001) classificaram as moléculas que possivelmente controlam as interações entre os simbioses em 5 tipos:

- Moléculas que influenciam o tropismo das hifas para as raízes (sinais rizosféricos);
- Moléculas para o contato e invasão das hifas (adesinas e hidrolases);
- Elementos de indução de modificações organogênicas em ambos os parceiros (hormônios e sinais secundários);
- Moléculas facilitadoras da sobrevivência dos fungos em detrimento do sistema de defesa vegetal;
- Moléculas coordenadoras das estratégias para as trocas metabólicas, como colonização de células vegetais e ramificação do micélio no solo.

Atualmente, o uso de técnicas modernas como os macro e microarranjos de cDNA, além de outras como o *Differential-Display Reverse Transcription - PCR* – DDRT-PCR, *Suppression Subtractive Hybridization* – SSH , em diferentes sistemas

ectomicorrízicos tem gerado uma grande quantidade de novos dados, trazendo avanços na compreensão das etapas de reconhecimento e controle da simbiose (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005). Isso porque, através destas técnicas, é possível observar e identificar a participação de milhares de genes ao mesmo tempo e relacioná-los com os diferentes estágios de formação da simbiose (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; JOHANSSON et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005; WRIGHT et al., 2005).

Através da tecnologia de microarranjos de cDNA para a observação do padrão de transcrição fúngica no sistema *Pisolithus tinctorius* - *Castanea sativa*, foi identificada a participação de vários genes com funções desconhecidas (ACIOLI-SANTOS, et al., 2008a). Um dos genes fúngicos identificados como estimulados na simbiose (Clone ID: 1440), batizado posteriormente de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor 1 - por apresentar uma expressão positiva entre 6-12h quando em indução micorrízica, teve sua porção 3' parcialmente caracterizada (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b). A análise preliminar do peptídeo traduzido de 75 aminoácidos (realizada através de interfaces bioinformáticas) apresentou similaridade a uma proteína sobexpressa pelo fungo ectomicorrízico *Schizophyllum commune* em situação de baixa disponibilidade de N. Os dados bioquímicos também revelaram a possibilidade de esse gene estar envolvido no processo de reconhecimento “fungo – planta”, no desenvolvimento da simbiose, dada a forte possibilidade de ser esta uma proteína transmembranar. Embora haja indícios de que este gene esteja relacionado à colonização ectomicorrízica, não foi encontrado nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas, nem de estrutura cristalizada similar em bancos de dados para o peptídeo traduzido (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b).

A falta de informação e a ausência de dados para serem utilizados em análises comparativas refletem a carência de estudos e de pesquisadores especializados para essa linha de investigação. Isso porque, com a modernização das técnicas de biologia molecular, foi gerada grande quantidade de dados (PODILA et al., 2002; LE QUÉRÉ et al., 2005), antes imperceptíveis devido às limitações das técnica então utilizadas.

Vieira (2008) listou 203 genes (ESTs – *expressed sequences tags*) de fungos ectomicorrízicos sob estimulação em oito categorias fisiológicas de acordo com suas prováveis funções e tendências de expressão no advento da simbiose: 1- crescimento e organização celular; 2- morfogênese; 3- metabolismo e energia; 4- síntese e interação protéica, regulação transcripcional e transducional; 5- transporte de íons, aminoácidos e

peptídeos; 6- proteínas membranares estruturais e de sinalização; 7- processamento de DNA/RNA; 8- defesa e morte celular programada. Segundo o autor, haveria para a formação da ectomicorriza, o surgimento de um novo programa genético direcionado à simbiose, sob a influência dos fatores tempo, organismo e ambiente.

Diante do que foi exposto e das novas descobertas no campo da expressão dos genes regulados ou influenciados pela simbiose (VOIBLET et al., 2001; PETER et al., 2003; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005), faz-se necessário entender o papel dos inúmeros genes (PODILA et al., 2002; MENOTTA et al., 2004; JOHANSSON et al., 2004), bem como relacioná-los aos modelos e hipóteses da simbiose (LE QUÉRÉ, 2005). A elucidação parcial do mecanismo de formação das ectomicorrizas poderá influenciar diretamente na maneira como essas associações são utilizadas nas diversas atividades econômicas, biotecnológicas e de conservação ambiental.

2.7 GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SIMBIOSE

Sabe-se que a formação da micorriza é determinada, em parte, pelo programa genético do fungo e da planta. A dinâmica de ativação e desativação dos conjuntos gênicos, em interação com o ambiente, irá determinar no decorrer do tempo o desenvolvimento da associação (VOIBLET et al., 2001; LE QUÉRÉ et al., 2005). Neste longo percurso que se inicia com a mobilização de moléculas sinalizadoras (TAGU & MARTIN, 1996) e vai até o início das trocas metabólicas, uma série de proteínas são sintetizadas e, como resultado final, tem-se uma associação plenamente estabelecida e funcional (LE QUÉRÉ et al., 2005).

Dentre as muitas necessidades da simbiose micorrízica está a formação de estruturas e compartimentos (LE QUÉRÉ et al., 2005). Para isso, é necessário que haja uma intensa atividade celular em benefício do crescimento e proliferação das células (BARKER et al., 1998). Alguns genes são relatados na literatura como parte deste processo e responsáveis por tais funções na célula. Podem-se destacar os genes responsáveis pela síntese das proteínas α -tubulina e actina, identificadas em micélio de *Suillus variegatus* e de *Paxillus involutus* em associação com *Pinus contorta*, ou em outros tecidos simbióticos (TIMONEN et al., 1996; TIMONEN & PETERSON, 2002). A α -tubulina pode estar relacionada com a formação dos microtúbulos, sendo estes

responsáveis por dar forma à célula, além de participar do mecanismo de divisão celular (MONTEIRO & ROSSI, 1999). Também são encontrados em culturas celulares de rápido crescimento (CONDEELIS, 1995) genes que codificam fatores de transcrição e alongamento celular (*translation elongation factor 1 α*). Esta proteína atua na tradução da informação do RNA mensageiro em aminoácido levando ao ribossomo o tRNA correspondente. Em ectomicorriza formada com o fungo *P. tinctorius* em associação com *E. globulus* foram encontrados alguns transcritos deste gene (VOIBLET et al., 2001). Outros fatores de iniciação da tradução (*Translation initiation fator 3 Sui1p*, *Translation initiation SUI1*) e alongamento (*EF-1 gamma*, *Elongation fator*) foram observados em ectomicorrizas (LE QUÉRÉ et al., 2005) participando da síntese do peptídeo como auxiliar do mRNA e tRNA (PHAN et al., 2001; SVITKIN et al., 2001). Mas antes de chegar ao ribossomo, o mRNA sofre maturação e retirada dos éxons, em um processo conhecido como *splicing* e a responsável por isso é a enzima *mRNA maturase bI2* (SZCZEPANECK & LAZOWSKA, 1996) encontrada em ectomicorrizas de *P. tinctorius* - *Eucalyptus globulus* (VOIBLET et al., 2001). Há também o gene *U6 snRNA-associated/Sm-like protein Lsm8* que, ao contrário do anterior, atua no decaimento do mRNA, juntamente com outras enzimas de funções semelhantes (HE & PARKER, 2000).

É claro que, no desenvolvimento e formação das estruturas como o manto e rede de Hartig, dentre outras, o fungo necessita gastar uma grande quantidade de energia. Essa alta demanda energética pode ser mensurada em parte pelo grande número de genes expressos que estão relacionados ao metabolismo e obtenção de energia nesses fungos, como visto em muitos sistemas ectomicorrízicos (VIEIRA, 2008). Já foram identificados genes codificantes da enzima hexoquinase em *Paxillus involutus* em associação com *Betula pendula* (LE QUÉRÉ et al., 2005). Também foram identificadas três novas formas da hexoquinase em micélio de *Tuber borchii*, com função relacionada ao catabolismo das hexoses, e sendo ela a primeira enzima desta via de assimilação deste composto (CECCAROLI et al., 1999). Outras enzimas descritas em sistemas ectomicorrízicos, que estão relacionadas diretamente ao aumento do metabolismo celular e obtenção de energia são a enolase, encontradas em micélio de *Tuber borchii* associado com *Tilia platyphyllos* (BABBITT et al., 1996); oxidase do citocromo c, presentes nas ectomicorrizas de *Paxillus involutus* x *Betula pendula* (LE QUÉRÉ et al., 2005) e a fosfatase ácida, detectada no micélio de *Pisolithus tinctorius* compatível na formação da interação com *Eucalyptus urophylla* (LEI et al., 1990).

Esse alto gasto de energia necessário para a formação e manutenção da micorriza é justificado, em parte, pela funcionalidade das trocas metabólicas essenciais aos simbioses. Para dar suporte a isso, alguns genes participam deste processo como o *mitochondrial carrier protein* que atua no transporte de ânions fosfatados (PALMIERI, 1994). Os genes que codificam proteínas de canais iônicos, como o *calcium channel*, *Al voltage dependent calcium channel* e o *acid sensitive K⁺ channel*, *Ca²⁺ transporting ATPase*, como moléculas responsáveis pelo transporte de cálcio, garantem o suprimento de um elemento fundamental para a fisiologia das ectomicorrizas (KIM et al., 1999; PODILA et al., 2002). Também existem os genes de transporte de proteínas como o *ran interactin giant nucleopore protein*, *peptide transporter protein*, e o gene para a β -*importin* (PODILA et al., 2002). A proteína codificada por este último gene realiza o transporte de histonas (proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA, para que este caiba dentro da célula) do citoplasma para o núcleo celular (JAKEL et al., 1999).

Dentre as diversas proteínas sintetizadas por fungos ectomicorrízicos encontram-se as SRAPs e as hidrofobinas (LAURENT et al., 1999; ACIOLI-SANTOS et al., 2008a). As SRAPs (*symbiosis related acid protein*) são proteínas que, possivelmente, fazem parte do sistema de adesão célula-a-célula e são necessárias na agregação das hifas à raiz hospedeira (LAURENT et al., 1999). Considera-se que essas proteínas são estimuladas pela simbiose, durante a formação de ectomicorrizas entre *P. tinctorius* e *E. globulus*, sendo uma característica marcante no desenvolvimento deste tipo de associação (DUPLESSIS et al., 2005).

As hidrofobinas são proteínas encontradas em diversos sistemas micorrízicos (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005) e estão presentes na parede celular do fungo, mas podem, também, ser encontradas na interface extracelular. Estes polipeptídios de pequena massa molecular apresentam regiões que podem estar envolvidas no crescimento aéreo e agregação das hifas entre a espécie fúngica e o hospedeiro (TAGU & MARTIN, 1996; KERSHAW & TALBOT, 1998; WÖSTEN & VOCHT, 2000).

Sabe-se que uma das vantagens da associação ectomicorrízica para a planta é a aquisição de resistência a metais pesados (BRUNNER & FREY, 2000) e isso foi evidenciado pela identificação de genes codificantes da glutathione S transferase em alguns sistemas ectomicorrízicos (PODILA et al., 2002; JOHANSSON et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005). Também foram identificados os genes da metalotioneína (HAERSLEV et al., 1995) e arsenito ATPase (MOREL et al., 2005). Estes podem atuar

no metabolismo de certos compostos xenobióticos de difícil assimilação pelas plantas e, graças a esses genes, a célula realiza a desintoxicação e combate o estresse oxidativo, o envelhecimento e a morte (HAYES & PULFORD, 1995; CATANEO et al., 2003).

Segundo Vieira (2008), o tecido simbiótico final resulta da interação físico/química entre raízes e células fúngicas, sendo produto da regulação espaço-temporal dos dois programas genéticos, os quais envolvem sensoriamento ambiental, comunicação célula-célula e construção de novas estruturas. Assim, o estudo dos genes de função desconhecida, regulados pela simbiose, tornar-se-á imprescindível para o melhor entendimento da associação, bem como para a maior eficácia no emprego das ectomicorrizas nas diversas atividades econômicas.

3 O GENE *PtSRR1*, UM POTENCIAL CONTROLADOR DA FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS

(Manuscrito para submissão ao Current Microbiology)

RESUMO

A simbiose ectomicorrízica resulta da expressão de vários genes cujas seqüências e funções devem ser conhecidas para uma melhor exploração desta simbiose. Utilizando microarranjos de cDNA para observar o padrão de transcrição fúngica na associação *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* nas horas iniciais da interação, foi identificado o gene *PtSSR1* sobreexpresso entre 6-12h, cuja porção 3' apresentou similaridade com uma seqüência fúngica de *Pisolithus microcarpus*, aos 21 dias de interação com *Eucalyptus*. O peptídeo putativo traduzido da ORF (75 aminoácidos) resultou em identidade com uma molécula fúngica sobreexpressa em baixa disponibilidade de nitrogênio. Este trabalho objetivou obter e caracterizar a seqüência completa do mRNA do *PtSRR1*. Discos de micélio foram repicados para meio MNM líquido e, após obtenção da biomassa, o RNA total foi extraído. A porção 5' do mRNA foi obtida via RACE, sendo o maior fragmento (400 pb) clonado e utilizado para transformar bactérias. A seqüência consenso (636 pb) foi obtida pela junção da nova porção 5' com a 3'preexistente. A análise estrutural do peptídeo traduzido da ORF (127 aminoácidos), realizada *in silico*, indica que *PtSRR1* apresenta dois sítios de N-glicosilação, dois de fosforilação, região de predição transmembranar composta por uma alfa-hélice hidrofóbica e região predominantemente hidrofílica composta por seis fitas-beta intercaladas por *loops*. Não foi possível obter a estrutura tridimensional da *PtSRR1*, sendo necessário estudos adicionais sobre seu papel como possível controlador/marcador de desenvolvimento fúngico durante estágios iniciais da ectomicorrização.

Palavras-chave: Expressão gênica, fungos ectomicorrízicos, genes simbiose-regulados.

3.1 INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas são associações simbióticas mutualísticas existentes entre certas espécies vegetais e fungos do solo (SMITH & READ, 1997). Esse tipo de simbiose vem sendo estudada há muito tempo e, aos poucos, os mecanismos de sinalização, desenvolvimento e formação estão sendo melhor compreendidos (LE QUÉRÉ et al., 2005).

Além da especificidade (fungo-hospedeiro) exigida entre os participantes da simbiose (MOLINA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1994), sabe-se que a etapa inicial de sinalização se dá pela síntese e reconhecimento de proteínas específicas (MARTIN et al., 2001; TAGU et al., 2002b) como as ectomicorrizinas, identificadas em micorrizas de *E. globulus* - *P. tinctorius* (HILBERT & MARTIN, 1988). Nessa classe de proteínas, dois grupos de polipeptídios têm sido destacados em diversos sistemas ectomicorrízicos: as hidrofobinas, presentes nas paredes celulares do fungo ou secretadas por ele na interface extracelular (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005; ACIOLI-SANTOS, 2008a), e as SRAPs (*symbiosis related acid protein*) que, possivelmente, fazem parte do sistema de adesão célula-a-célula, necessárias na agregação das hifas à planta (LAURENT et al., 1999). Estas proteínas estimuladas pela simbiose são consideradas fortes marcadores do desenvolvimento ectomicorrízico para períodos tardios de indução (contato, diferenciação e funcionamento da simbiose) (DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005).

Recentemente, em uma abordagem que utilizou microarranjos de cDNA para a observação do padrão de transcrição fúngica no sistema *Pisolithus tinctorius* - *Castanea sativa*, foi identificada a participação de vários genes, com função desconhecida, sobreexpressos em períodos curtos de interação (ACIOLI-SANTOS et al., 2008a). Um dos genes (Clone ID: 1440), batizado posteriormente de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor 1 (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b), apresentou expressão relativa positiva entre 6-12h após contato com o hospedeiro vegetal. Esse fato chamou a atenção dos pesquisadores para a descoberta de um possível marcador do início da sinalização/comunicação entre os parceiros em períodos curtos de interação. Devido a essas evidências, o gene *PtSRR1* teve sua porção 3' parcialmente caracterizada por Acioli-Santos et al. (2008b). A análise preliminar do peptídeo traduzido de 75 aminoácidos (realizada através de interfaces bioinformáticas) indicou a similaridade

deste a uma proteína de origem fúngica expressa pelo microorganismo quando submetido à situação de baixa disponibilidade de N₂ (Número de acesso AF335537). Os dados também revelaram a possibilidade deste gene estar envolvido no processo de reconhecimento fungo/planta, dada a alta probabilidade de ser esta uma proteína transmembranar com sítios de interação voltados para o exterior da célula (ACIOLISANTOS et al., 2008b).

Assim, tornou-se imprescindível a obtenção da ORF completa do gene *PtSRR1* e a sua caracterização preliminar (proteína PtSRR1) *in silico* através de programas bioinformacionais como um passo importante para o melhor entendimento da etapa de sinalização e controle da simbiose. Esses dados contribuirão para o melhor entendimento da associação, bem como para maior eficácia no emprego das ectomicorrizas nas diversas atividades econômicas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material biológico e condições de cultivo

Uma cultura do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch, fornecida pelo Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT) da Faculdade de Ciências de Lisboa, Universidade de Lisboa-Portugal, foi repicada para 20 mL de meio sólido Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969), em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Para a obtenção da biomassa fúngica, discos de meio (5 mm de diâmetro) cobertos de micélio foram retirados das bordas das colônias e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio MNM líquido e incubados em estufa B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro e sem agitação, por 2 meses. Posteriormente, a biomassa foi filtrada em papel filtro, lavada 3 vezes com água destilada esterilizada e seca com papel toalha para a retirada do excesso de meio de cultura. Imediatamente, o micélio fúngico foi congelado em nitrogênio líquido e conservado em freezer a - 80 °C, até a etapa de extração do RNA total.

3.2.2 Extração de RNA

Com a ajuda de almofariz e pistilo de porcelana, a biomassa fúngica foi macerada com nitrogênio líquido até se transformar em pó. Em seguida, foi extraído o

RNA total utilizando o Kit PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen®), segundo as recomendações do fabricante. Foram adicionados cerca de 100 mg do micélio em pó aos tubos de Eppendorf, juntamente com a solução de lise do kit. Em seguida, o micélio foi macerado com micropistilo por aproximadamente 1 min, seguido de agitação em vórtex por 3 min e incubação em temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, a amostra foi macerada novamente por 1 min e centrifugada por 2 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 µl de etanol 70%. Por inversão do tubo, a amostra foi gentilmente homogeneizada. Transferiram-se 500 µl para uma coluna de separação (*spin-cartridge*) e fez-se uma centrifugação de 15 s a 13.000 rpm, sendo o filtrado descartado. Esta etapa foi repetida até que toda a amostra fosse filtrada na mesma coluna. Em seguida, procedeu-se a lavagem da amostra na coluna com a adição de 350 µl do tampão de lavagem I (Kit PureLink™), centrifugação por 15 s (13.000 rpm) e descarte do filtrado.

Após a lavagem, a amostra foi tratada na coluna com a enzima DNase I 1000u (Fermentas® Life Sciences). Para isso, foi preparado um mix contendo 67 µl de água livre de RNase, 8 µl de tampão, 5 µl da enzima para um volume final de 80 µl. O mix foi imediatamente adicionado ao centro da coluna e incubado por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, repetiu-se a lavagem com tampão I por duas vezes. Na segunda lavagem, foram acrescentados 700 µl do tampão de lavagem I à coluna, seguido de uma centrifugação de 25 s a 12.000 rpm. O filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem II à coluna e realizou-se uma centrifugação de 25 s com descarte do filtrado. Esta etapa foi repetida uma vez. Finalmente, foi feita uma centrifugação por 1 min para secagem completa da coluna. O tubo coletor foi substituído por um novo tubo (Recovery Tube) para a eluição do RNA. Nesta etapa, adicionaram-se 50 µl de água livre de RNase ao centro da coluna, incubou-se por 1 min em temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 min a 13.000 rpm. Ao final do processo, foram obtidos 50 µl do filtrado contendo o RNA total.

3.2.3 Análise qualitativa e quantificação de RNA

A quantificação do RNA total das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Eppendorf® Biophotometer), segundo Sambrook et al. (1989). A quantidade foi calculada em µg µL⁻¹ através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times Fc \times fd}{1000}$$

onde $A_{260\text{nm}}$ é o valor de leitura da amostra a 260 nm; **Fc** corresponde ao fator de conversão, no qual a A_{260} máxima é 1 e corresponde a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNA; **fd** corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura; o resultado da multiplicação é dividido por mil para obtenção da concentração em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorbância em 260 e 280 nm, assim como na visualização do RNA, após eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X livre de RNase. A qualidade da extração foi aferida pela observação da proporção (1:2:1) dos valores de absorbância nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 nm, respectivamente.

3.2.4 Obtenção da ORF do gene *PtSRR1* via RACE – 5'

A porção 5' do gene *PtSRR1* foi obtida com o uso do kit GeneRacer (*full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends* – RLM – RACE, Invitrogen®), que possibilita a obtenção de cDNAs completos, segundo as recomendações do fabricante. Inicialmente, o RNA total foi tratado com uma fosfatase de intestino de bezerro (CIP) que removeu a extremidade 5' fosfato dos RNAs truncados ou incompletos, impedindo a ligação do GeneRacer™ RNA Oligo. O RNA desfosforilado foi tratado com pirofosfatase ácida de tabaco (TAP), enzima responsável pela remoção da estrutura 5' CAP dos mRNAs completos. Após a retirada dessa estrutura, apenas os mRNAs completos terão a extremidade 5' fosfato livre. Na porção 5' fosfato livre, foi ligado o GeneRacer™ RNA Oligo, pela enzima T4 RNA. Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA pela transcriptase reversa (SuperScript II - Invitrogen®). Foram realizadas reações de PCR para a amplificação dos maiores fragmentos utilizando iniciadores fornecidos com o kit, direcionados à região do GeneRacer™ RNA Oligo, combinados com iniciadores gene específicos direcionados à porção 3' conhecida: PT-1440 REV 5'-AAATCGTTCAGAGAGATAAAGTTG-3' (ACIOLI-SANTOS, 2006) e 1R PCR REV 5'-CGTCCGGTACTGTGACCATC-3'. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador (Benchtop® UVP-TFM-26).

3.2.5 Clonagem do gene *PtSRR1*

A clonagem do maior fragmento obtido foi realizada utilizando o kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega®), sistema apropriado para a clonagem de produtos de PCR. Os vetores pGEM®-T Easy Vectors possuem extremidades livres (3'Timina) que

promovem ligação eficiente aos produtos de PCR gerados pela atividade de certas polimerases termoestáveis, que adicionam ao final do fragmento amplificado uma deoxiadenosina. Os passos para clonagem são: adenilação, ligação e transformação. Na etapa de adenilação foram utilizados: 5 µl do produto PCR, 1 µl de 10X PCR *Buffer*, 0,3 µl de Mg Cl₂ 50 mM, 0,2 µl de dATP's 100 mM, 1 µl de Taq DNA Polimerase, 2,5 µl de Água MiliQ, para um volume final de 10 µl. Em seguida, a amostra foi posta em termobloco a 72°C por 20 min. Na reação de ligação foram utilizados: 2 µl do produto de adenilação, 5 µl de 2X *Buffer*, 0,5 µl de Vetor pGEM T, 1 µl de T4 DNA ligase, 1,5 µl de Água MiliQ para um volume final de 10 µl. A amostra foi incubada de um dia para o outro. Para a transformação foi preparada uma placa de LB + ampicilina 50 µg/µl com 100 µl de IPTG a 100 mM e 20 µl de X-Gal a 50 mg/ml. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 5 µl da reação de ligação e 50 µl de células competentes DH10B. Em seguida, a amostra foi incubada no gelo por 20 min e levada ao banho-maria (42°C) por 50 s para novamente permanecer em gelo por 2 min. Foi adicionado à amostra um volume de 950 µl do meio LB. A amostra foi incubada a 37°C por 1 h e 30 min em agitador orbital. Cerca de 250 µl desta amostra foram distribuídos na placa LB+AMP 50 µg/µl, IPTG 100 mM, X-GAL 50 mg/ml. A placa foi incubada em estufa a 37°C de um dia para o outro para a visualização das colônias brancas recombinantes.

3.2.6 Confirmação da obtenção do gene *PtSRR1*

A inserção do gene no vetor foi confirmada via PCR, utilizando-se iniciadores específicos, dirigidos ao vetor de clonagem. Inicialmente, foram realizadas mini-preps para extração dos plasmídeos das bactérias DH10B recombinantes. Seguiu-se uma reação de PCR, com iniciadores específicos para região que flanqueia o sítio de clonagem. Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o Kit comercial ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de seqüenciamento utilizada baseia-se no método de Sanger (SANGER et al., 1977) que utiliza didesoxirribonucleotídeos acoplados a cromóforos fluorescentes. Os produtos das reações foram analisados em seqüenciador ABI® PRISM 3100 Genetic Analyzer, (Applied Biosystems). Em seguida, foi feita a edição das seqüências (ApE® v1.15 e Chromas Lite® v 2.01) e a construção de *contigs* (SeqMan® NGen v1.2), bem como a busca no NCBI utilizando a ferramenta *online* BLASTx

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para observação de similaridade significativa com seqüências previamente depositadas.

3.2.7 Análise das seqüências

A análise estrutural do peptídeo putativo foi realizada através de interfaces bioinformáticas (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/prosite>). De maneira similar, foram consultadas bases de dados internacionais na busca de domínios específicos conservados do peptídeo traduzido do *PtSRR1* (The Inter Pro software <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan>).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 O gene *PtSRR1*

A partir da técnica RACE 5', foi obtido um fragmento parcial de ~400 pb, correspondente à porção 5' do gene *PtSRR1*. Após a avaliação dos cromatogramas, edição e alinhamento das seqüências, foi gerada uma única seqüência consenso combinando o novo fragmento com o previamente conhecido de 432 pb (número de acesso EL563703), correspondente a porção 3' do mesmo gene, através do uso de programas de bioinformática (SeqMan[®] NGen v1.2). O fragmento final de 636 pb apresentou uma ORF mais provável de 127 Aa. A escolha da ORF mais provável foi realizada através da ferramenta de busca de ORF contida no programa ApE[®] v1.15. Foram observadas regiões não traduzíveis (UTRs: *untranslated regions*) *upstream* na porção 5' e *downstream* na porção 3' da ORF mais provável. Também se observou a metionina inicial no códon 49 e um *Stop-codon* a partir do nucleotídeo 425 e a seqüência Kozak com variações (**Figura 4**).

(NFTI), e dois sítios de fosforilação da Caseína Quinase II, nas posições 65 a 68 (TNSE) e 99 a 102 (TVPD), respectivamente (**Figura 5**). Adicionalmente, a análise da estrutura secundária apresenta PTSRR1 como uma proteína contendo uma única alfa-hélice (região de baixa predição transmembrânica aproximadamente entre os resíduos 10 a 20) e seis possíveis fitas-beta ao longo de sua estrutura. (**Figura 5**).

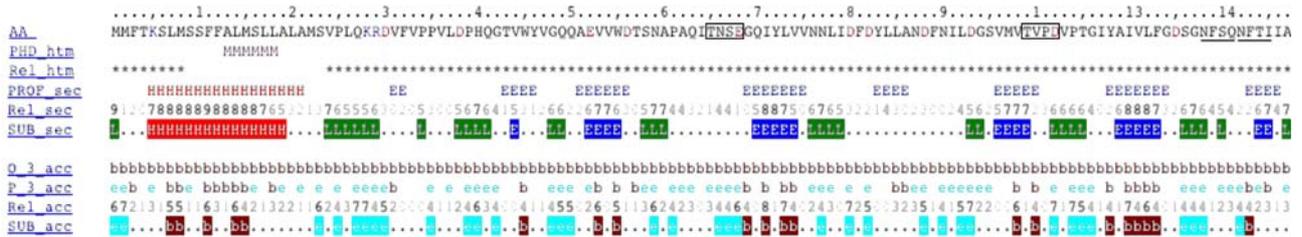


Figura 5. Predição da estrutura secundária e domínio transmembrânico de PTSRR1. Legenda: AA=seqüência de aminoácidos, *PHD_htm*=predição de Hélices transmembrânicas (M=hélice transmembrânica, espaços em branco=regiões não membranares), *Rel_htm*=índice de confiabilidade da predição PHD_htm (Predições confiáveis estão marcadas por *), *PROF_sec*=predição da estrutura secundária (H=Hélice, E=fita/folha, branco: “loop”), *Rel_sec*=índice de confiabilidade da predição PROF_sec (0=baixo até 9=alto), *SUB_sec*=subconjunto de todas as predições PROF_sec, para todos os resíduos com uma meia de exatidão > 82% (L= “loop”, “.”=sem predição para o resíduo), *O_3_acc*=acessibilidade relativa ao solvente observada (b=0-9%, i=9-36%, e=36-100%). *P_3_acc*=acessibilidade relativa ao solvente predita, *Rel_acc*: índice de confiabilidade da predição de *P_3_acc*, *SUB_acc*:subconjunto da predição de *P_3_acc*, para todos os resíduos com uma correlação média > 0.69. Sítios de glicosilação NFSQ e NFTI = (—); sítios de fosforilação TNSE e TVPD = (□). Análises realizadas em <http://www.predictprotein.org>

A análise da localização subcelular indicou que a proteína apresenta uma forte predição de participar da via de secreção celular. Há também a possibilidade de a *PtsRR1* ser um peptídeo de sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). A análise de hidrofobicidade realizada (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>) para o peptídeo *PtSRR1* demonstrou que este possui uma região inicial fortemente hidrofóbica. (**Figura 6**).

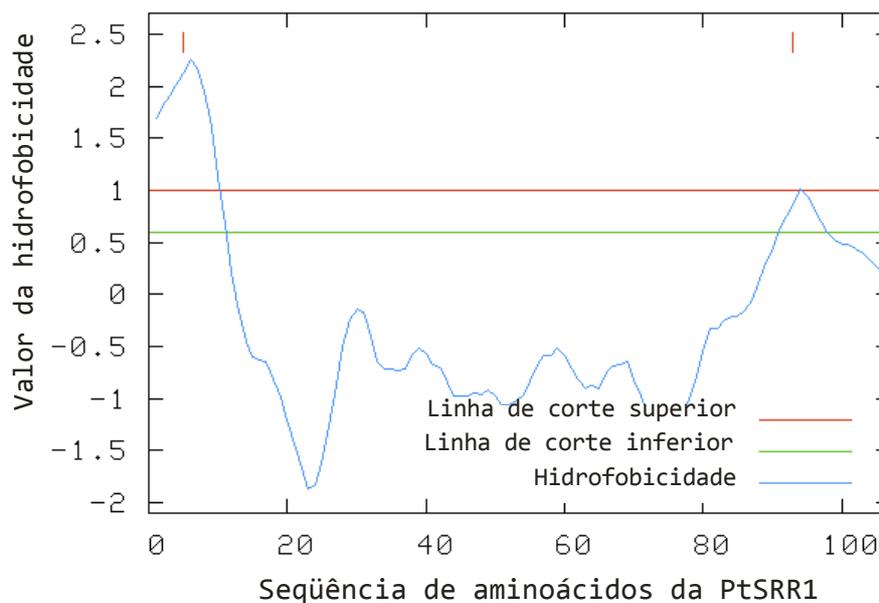


Figura 6. Análise de hidrofobicidade da proteína putativa PtSRR1. Observa-se uma região inicial de forte natureza hidrofóbica (Escala pelo método Kyte & Doolittle, 1982).

O estudo da estrutura secundária da proteína putativa PtSRR1 (<http://www.predictprotein.org>) mostrou a presença de uma única região de baixa predição transmembrânica em alfa-hélice, aproximadamente entre os resíduos 10 a 20, e seis possíveis fitas beta ao longo de sua estrutura. Não foi possível a obtenção do modelo tridimensional baseado na modelagem por homologia de proteínas e suas respectivas estruturas cristalizadas depositadas em bancos de dados como o RCSB protein databank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). As análises realizadas pelo *GLOBE prediction*, através de ferramentas de globularidade, indicam que a proteína PtSRR1 não é globular (<http://www.predictprotein.org>).

3.4 DISCUSSÃO

Através de técnicas modernas como a análise de microarranjos de cDNA, novas informações vêm sendo reveladas sobre os genes expressos diferencialmente em ectomicorrizas para as vias de reconhecimento, formação e desenvolvimento da simbiose (LE QUÉRÉ et al., 2005, ACIOLI-SANTOS et al., 2008a). Dados que corroboram essa teoria foram apresentados por Vieira (2008). Esse autor agrupou 203 ESTs de genes fúngicos ectomicorrízicos, relacionados com a formação e desenvolvimento da simbiose, em oito categorias fisiológicas que vão desde genes de

crescimento e organização celular, até defesa e morte celular programada. De maneira similar, outro trabalho de revisão também lista diferencialmente genes expressos com funções relacionadas a processos de reconhecimento, fixação do micobionte na superfície radicular, formação de interface simbiótica, sinalização, trocas protéicas, organogênese e metabolismo (MARTIN et al., 2001).

Em um trabalho pioneiro, mudanças na biossíntese de proteínas foram observadas nos estágios iniciais da associação entre *Eucalyptus grandis*-*Pisolithus tinctorius* em gel bidimensional de poli(acrilamida). Foram testados três isolados distintos de *P. tinctorius*, considerando sua capacidade de infectividade e de formação de ectomicorrizas com *E. grandis* W. Hill ex Maiden: isolado H506=não forma micorriza com essa planta, isolado 441=apresenta infectividade mediana, e isolado H2144=apresenta alta infectividade. O isolado 441 não causou mudanças na biossíntese de proteínas nas raízes hospedeiras, no entanto, alterações drásticas na biossíntese de proteínas foram observadas após o contato inicial com os demais isolados. As principais alterações foram observadas em um grupo de polipeptídios ácidos de fungos (peso molecular aparente 28-32 kDa), incluindo a ectomicorrizina E₃₂. Estes polipeptídios apareceram pela primeira vez na ocasião do contato e sua síntese foi aumentada durante a formação das micorrizas, sugerindo um papel no desenvolvimento micorrízico, provavelmente como proteínas estruturais. Uma sobreexpressão de genes para síntese de polipeptídios regulados pela simbiose de fungos foi fortemente correlacionada com a infectividade da estirpe (BURGESS et al., 1995).

Há indícios de que o início da associação ocorra pela síntese e reconhecimento de moléculas sinalizadoras lançadas na rizosfera pela planta (LAGRANGE et al., 2001) e pelo micobionte envolvido (TAGU et al., 2002a,b; DITENGOU et al., 2003). Proteínas simbiose-específicas (ectomicorrizinas) (HILBERT & MARTIN, 1988), especialmente SRAPs e hidrofobinas, têm sido relacionadas ao processo de reconhecimento e adesão da hifa à raiz hospedeira bem como às etapas de formação do manto (LAURENT et al., 1999; TAGU et al., 1996). Assim, estas proteínas são descritas como fortes marcadores do desenvolvimento ectomicorrízico para períodos mais avançados de formação da simbiose (DUPLESISS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005). Atualmente o que se busca é o estudo dos genes diferencialmente expressos para períodos curtos (horas) de interação (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b) visando a obtenção de potenciais marcadores moleculares precoces para a formação de ectomicorriza.

A seqüência do gene *PtSRR1* completo (636 pb), embora tenha sido obtida em situação de não indução, mostrou alinhamento significativo com duas seqüências previamente depositadas. A nova seqüência completa do gene em estudo apresentou 78% de similaridade com uma seqüência do fungo *Pisolithus microcarpus* (Número de acesso CB010071, PETER et al., 2003) em associação ectomicorrízica com *Eucalyptus globulus* após 21 dias de contato. Também 78% de identidade foram obtidos na comparação da nova seqüência com uma de cDNA de amostra do fungo *Pisolithus tinctorius* / *Eucalyptus globulus* com 4 dias de interação (Número de acesso BF942674, VOIBLET et al., 2001).

Observando-se a região não traduzível do gene *PtSRR1* (porção UTR 5'), foi encontrada a seqüência consenso de Kozak que ocorre em mRNAs de eucariotos. A seqüência consenso de Kozak é seguida do códon de iniciação e de outra guanina ((gcc)gccRccAUGG, onde R pode ser uma purina (adenina ou guanina) três bases acima do códon de iniciação(AUG), KOZAK, 1987). A seqüência Kozak tem papel importante no início do processo de tradução (DE ANGIOLETTI et al., 2004), já que é reconhecida pelo ribossomo (KOZAK, 1984). Para o gene *PtSRR1* foi observado a presença da seqüência Kozak com diferenças nos nucleotídeos -2 (A), -1(A) e 4 (A). No entanto essas diferenças são aceitáveis, já que pode haver variação de acordo com o tipo de organismo estudado. Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, foi observado uma tendência a resíduos-A na região 5' que antecede a metionina inicial (HAMILTON et al., 1987).

Ao nível protéico, o peptídeo traduzido a partir da ORF mais viável do *PtSRR1* apresentou um alinhamento significativo com 4 seqüências de proteínas previamente depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Das quatro seqüências citadas anteriormente, três referem-se a uma proteína predita isolada do fungo *Laccaria bicolor* (Número de acesso S238N-H82), quando em situação de simbiose (Números de acesso: XP_001876100, XP_001881785 e XP_001876099). Tais proteínas teriam relação com as *SSPs* (*Small secreted proteins*), pequenas proteínas secretadas de função desconhecida, sobreexpressas e sintetizadas nos tecidos simbióticos (MARTIN et al., 2008). A última seqüência apresentou identidade com um peptídeo de *Schizophyllum commune*, sobreexpressa sob baixa condição de nitrogênio (Número de acesso AF335537). Uma provável explicação é dada pelo fato de a planta consumir o N, criando uma zona de depleção, e liberar C na forma de açúcares, como os carboidratos. Essa baixa condição de nitrogênio e enriquecimento de C na

rizosfera pode servir de estímulo trófico inespecífico para a germinação dos propágulos fúngicos presentes no solo, direcionando a hifa para a raiz hospedeira (TAGU et al., 2002 a).

Tagu et al. (1996) observaram duas ESTs, a partir de cDNA no fungo *Pisolithus tinctorius* em ectomicorriza com *Eucalyptus globulus*, codificando as proteínas HydPt-1 e HydPt-2 que fazem parte da família das hidrofobinas. O tamanho dos fragmentos encontrados, de 718 e 455 pares de bases, respectivamente, foi similar ao do gene *PtSRR1*. A ORF correspondente apresentou 140 e 118 aminoácidos, respectivamente. Esses mRNAs foram mais expressos nos estágios de diferenciação, durante a colonização das raízes hospedeiras. Outra hidrofobina identificada a partir de cDNA no micélio de *Pisolithus tinctorius*, durante a formação de ectomicorriza na superfície radicular de eucalipto, foi denominada HydPt-3. Esta hidrofobina apresentou diferenças na sua sequência em comparação às hidrofobinas anteriores (DUPLESSIS et al., 2001). Esses autores concluíram que mudanças nas concentrações de glicose ou amônio, no crescimento médio, não influenciaram na acumulação de qualquer mRNA de hidrofobina em *Pisolithus* spp., sugerindo que outros fatores atuam como reguladores da expressão destes genes em ectomicorizas para a fase de contato da hifa com a raiz hospedeira no desenvolvimento do manto (1-6 dias após a indução).

Assim como o *PtSRR1* (ACIOLI-SANTOS et al., 2008b), outras moléculas diferencialmente expressas foram observadas em fungos do gênero *Pisolithus*: as SRAPs, consideradas fortes marcadores do desenvolvimento inicial da ectomicorriza após haver o contato entre os simbiontes (DUPLESSIS et al., 2005; LAURENT et al., 1999; VOIBLET et al., 2001). Um desses peptídeos (renomeado de PtSRAP₃₂) apresentou entre 31 e 32-kDa, tendo o seu transcrito a representação de 10% dos cDNAs diferencialmente expressos. A quantidade destes transcritos sofreu um aumento quando houve a formação do manto pelas hifas, sugerindo que as SRAPs podem fazer parte do sistema de adesão célula-a-célula necessárias à agregação da hifa à raiz (LAURENT et al., 1999). No entanto, não há relatos da síntese desses peptídeos para as primeiras horas de interação, como o que acontece com o gene *PtSRR1* estimulado entre 6-12 horas após contato.

Adicionalmente, sabe-se que as proteínas capazes de interagirem com as integrinas possuem uma sequência de resíduos de aminoácidos: Arg-Gly-Asp (RGD). Essa sequência pode apresentar variações e sua função pode estar relacionada ao sítios de adesão e reconhecimento celular (RUOSLAHTI, 1996). Nas SRAPs, pertencentes a

uma família de proteínas sintetizadas por fungos ectomicorrízicos, foi observada a tríade de aminoácidos RGD responsável por conferir sítios de adesão e ligação às integrinas. Na micorrização, este domínio pode explicar, em parte, a função dessas proteínas uma vez que participam das etapas de pré-infecção, com a chegada das hifas à raiz do hospedeiro (LAURENT et al., 1999). O domínio para RGD, bem como as suas variações possíveis (RUOSLAHTI, 1996) não foram encontrados para a proteína *PtSRR1*. Esse não é um fato isolado visto que acontece com outros genes presentes em sistemas ectomicorrízicos em formação (NEHLS et al., 1999; SUNDARAM et al., 2001).

A ORF mais viável do gene *PtSRR1* completo entrou em fase com a análise realizada por Acioli-Santos et al. (2008b), trazendo maior confiabilidade e margem de segurança para as análises de predição da estrutura protéica. Acioli-Santos et al. (2008b) apontaram regiões de modificações pós-traducionais para o fragmento 3' parcial do *PtSRR1* (dois sítios de fosforilação e dois de glicosilação). Esse dado se repetiu após análises do gene completo com diferenças na localização desses resíduos, provavelmente devido ao aumento da sequência. Também foi reforçada a idéia de que a proteína apresenta uma região de predição transmembranar composta por uma alfa-hélice entre os resíduos 10 a 20, e outra região composta por seis fitas-beta intercaladas por *loops*. Esta porção instável estaria voltada para fora da célula, com um possível sítio de clivagem próximo à membrana. Esses dados indicam que a proteína *PtSRR1* pode agir de duas formas: como um receptor ou como uma proteína secretada durante as fases iniciais de formação da simbiose. Esses resultados também mostram claramente a necessidade de estudos adicionais sobre o gene *PtSRR1* e sua proteína putativa para a confirmação da sua função como potencial controlador/marcador do desenvolvimento fúngico.

4 CONCLUSÕES

- O gene *PtSRR1* pode ser isolado mesmo em situação de não indução ectomicorrízica;
- O método RACE 5' é eficaz na obtenção do cDNA completo do gene de interesse permitindo a sua amplificação por PCR a partir de amostras com poucas cópias do RNA mensageiro;
- A identificação da seqüência de KOZAK na UTR 5', da metionina inicial e do *stop-codon*, indica que o gene putativo está completo;
- A análise de predição *in silico* da estrutura da *PtSRR1* indica que a proteína é transmembranar com uma região de alfa-hélice de natureza hidrofóbica inserida na membrana e uma porção externa com fitas beta intercaladas por *loops* e um possível sítio de clivagem próximo a membrana;
- A seqüência obtida não corresponde a nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas nem é similar em relação a estruturas cristalizadas disponíveis em bancos de dados.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B. **Expressão gênica no fungo *Pisolithus tinctorius* em etapas iniciais da interação ectomicorrízica com *Castanea sativa*: estudo do padrão de transcrição e de possíveis fatores de regulação da simbiose.** Lisboa: Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal (Tese), 169 p., 2006.
- ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; LIMA, C.E.P.; FIGUEIREDO, A.; SEBASTIANA, M.; PAIS, M.S. *PtSRR1*, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. **Brazilian Jornal Microbiol** (submetido), 2008a.
- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A.M.; BALDE, A.; MAIA, L.C.; PAIS, M.S. Fungal transcript pattern during the preinfection stage (12 h) of ectomycorrhiza formed between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* roots, identified using cDNA microarrays. **Current Microbiol**, 2008b.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 307-313, 2001.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v.11, p.3-42, 2001.
- BABBITT, P. C.; HASSON, M. S.; WEDEKIND, J. E.; PALMER, D. J.; BARRETT, W. C.; REED, G. H.; RAYMENT, I.; RINGE, D.; KENYON, G. L.; GERLT, J. A. The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the r-protons of carboxylic acids. **Biochemistry**, v.35, p.16489-16501, 1996.
- BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; ZIPFEL, W.; LAMMERS, P.; SHACHAR-HILL, H. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 244, p.189-197, 2002.
- BARKER, S. J.; DUPLESSIS, S.; TAGU, D. The application of genetic approaches for investigations of mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.244, p.85-95, 2002
- BARKER, S. J.; TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. **Jornal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.144-154, 2000.

- BARKER, S. J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, v.116, p.1201-1207, 1998.
- BARROSO, J.; NEVES, H.C.; PAIS, M.S. Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). **The New Phytologist**, v. 103, p. 745-749, 1986.
- BELLEI, M. M.; CARVALHO, E. M. S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Coord.). Microbiologia do Solo. **Sociedade Brasileira do Solo**, p.297-318, 1992.
- BLEDSOE, C. S.; RYGIEWICZ, P. T. Ectomycorrhizas affect ionic balance during ammonium uptake by Douglas-fir roots. **New Phytologist**, v.102, p.271-283, 1986.
- BONFANTE-FASOLO, P.; SPANU, P. Pathogenic and endomycorrhizal association. In: MORRIS, J. R.; READ, D.; VARMA, A. K. (Eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research - Methods in Microbiology**. Academic Press, London, p.602-628, 1994.
- BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v.154, p.275-304, 2002.
- BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v.4, n.1, p.13-27, 2001.
- BRUNNER, I.; FREY, B. Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. **Environmental Pollution**, v.108, p.121-128, 2000.
- BURGESS, T.; LAURENT, P.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; MARTIN, F. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, v.195, p.408-417, 1995.
- CAIRNEY, J. W. G. Evolution of mycorrhizal systems. **Naturwissenschaften**, v.87, p.467-475, 2000.
- CAIRNEY, J. W. G. *Pisolithus*-death of the pan global super fungus. **New Phytologist**, v.153, p.199-211, 2002.

- CAIRNEY, J. W. G.; CHAMBERS S. M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. **Mycorrhiza**, v.7, p. 117-131, 1997
- CARVALHO, D. Aspectos bioquímicos da relação fungo-planta em ectomicorrizas. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.) **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, p.67-100, 1996.
- CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.307-312, 2003.
- CECCAROLI, P.; SALTARELLI, R.; BUFFALINNE, M.; PICOLLI, G.; STOCCHI, V. Three different forms of hexokinase are identified during *Tuber borchii* mycelium growth. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.194, n.1-2, p.71-77, 1999.
- CHALOT, M.; JAVELLE, A.; BLAUDEZ, D.; LAMBILLIOTE, R.; COOKE, R.; SENTENAC, H.; WIPF, D.; BOTTON, B. An update on nutrient transport process in ectomycorrhizas. **Plant and Soil**, v.244, p.165-175, 2002.
- CHILVERS, G. A. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. **Australian Journal of Botany**, v.16, p.49-70, 1968.
- CONDEELIS, J. Elongation factor 1 α , translation and the cytoskeleton. **Trends in Biochemical Sciences**, v.20, p.169-170, 1995.
- CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI,S.;GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, p.1017-1028, 1998.
- COSTA, M.D.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES A.C. Ectomicorrizas: a face oculta das florestas. Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 29: 38-45, 2002.
- CRAFT, C.B.; MILLER, C.O. Detection and quantification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 54, p. 586-588, 1974.

- DE ANGIOLETTI, M.; LACERRA, G.; SABATO, V.; CARESTIA, C. Beta+45 G --> C: a novel silent beta-thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. **British Journal of Haematology**, v.124, n.2, p.224-31, 2004.
- DITENGOU, F. A.; LAPEYRIE, F. Hypahorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.13, p.151-158, 2000.
- DITENGOU, F. A.; RAUDASKOSKI, M.; LAPEYRIE, F. Hypahorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganization of the actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp. *biscotata* root hairs. **Planta**, v.218, n.2, p.217-225, 2003.
- DUDDRIDGE, J. A.; MALIBARI, A.; READ, D. J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. **Nature**, v.287, p.834-836, 1980.
- DUDDRIDGE, J. A.; READ, D. J. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. I Ectomycorrhizal development on pine in the field. **New Phytologist**, v.96, p.565-573, 1984.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.; TAGU, D.; MARTIN, F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.165, p.599-611, 2005.
- DUPLESSIS, S.; SORIN, C.; VOIBLET, C.; PALIN, B.; MARTIN, F.; TAGU, D. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. **Current Genetics**, v.39, n.5-6, p.335-339, 2001.
- EK, M.; LJUNGQUIST, P. O.; STENSTROM, E. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. **New Phytologist**, v.94, p.401-407, 1983.
- EZAWA, T.; SMITH, S. E.; SMITH, F. A. P metabolism and transport in AM fungi. **Plant and Soil**, v.244, p.221-230, 2002.
- FEUGEY, L.; STRULLU, D.G.; POUPARD, P.; SIMONEAU, P. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, v.144, p.541-547, 1999.

- FRANK, A. B. Über die aufwurzelymbiose beruhend. Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische. Pilz. Ber.dt. **Bot. Ges**, v.3, p.128-145, 1885.
- FRANK, A. B. Die Bedeutung der Mykorrhiza Pilze für die gemeine Kiefer. **Forstwissenschaftliches Centralblatt**, v.16, p.1852-1890, 1894
- GAY, G.; DEBAUD, J. C. Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.141-146, 1987.
- GARBAYE, J. Competitivité des champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Revue Forestière Française**. v.6, p.33-43, 1984.
- GARBAYE, J. **Utilisation des mycorhizes en sylviculture**. In: STRULLU, D. G. (Ed.). Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Paris: Lavoisier, p.197-250, 1990.
- GEA, L.; NORMAND, L.; VIAN, B.; GAY, G. Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. **New Phytologist**, v.128, p.659-670, 1994.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Southern Brazil. **Mycologia**, v.92, n.6, p.1166-1177, 2000.
- GIACHINI, A.J.; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, v.14, p.375-381, 2004.
- GROSS, E.; CASAGRANDE, L.I.T.; CAETANO, F.H. Ultrastructural study of ectomycorrhizas on *Pinus caribaea* Morelet. var. *hondurensis* Barr. & Golf. seedlings. **Acta botanica brasílica**, v.18, n.1, p.1-7. 2004.
- GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins - symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas. **Planta**, v.188, p.129-136, 1992.
- HAERSLEV, T.; JACOBSON, G. K.; ZEDELER, K. The prognostic significance of immunohistochemically detectable metallothionein in primary breast carcinomas. **Acta**

- Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.103, n.4, p.279-285, 1995.
- HALL, I. R.; WANG, Y.; AMICUCCI, A. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.10, p.433-438, 2003.
- HAMILTON, R.; WATANABE, C. K.; BOER, H. A. Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. **Nucleic Acids Research**, v.15 n.8, p.3581-93, 1987.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, n.6, p.445-600, 1995.
- HE, W.; PARKER, R. Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, n.3, p.346-350, 2000.
- HILBERT, J. L.; COSTA G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizin synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991.
- HILBERT, J. L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of the ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. **New Phytologist**, v.110, p.339-346, 1988.
- HORAN, D. P.; CHILVERS, G. A.; LAPEYRIE, F. Time-sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v.109, n.4, p.451-458, 1988.
- HORTON, T. R.; BRUNS, T. D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. **Molecular Ecology**, v.10, p.1855-1871, 2001.
- JAKEL, S.; ALBIG, W.; KUTAY, U.; BISCHOFF, F. R.; SCHWAMBORN, K.; DOENECKE, D.; GORLICH, D. The importin β /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.18, n.9, p.2411-2423, 1999.
- JOHANSSON, T.; LE QUÉRÉ, A.; AHREN, D.; SÖDERSTRÖM, B.; ERLANDSSON, R.; LUNDEBERG, J.; UHLÉN, M.; TUNLID, A. Transcriptional responses of *Paxillus*

- involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.17, n.2, p.202-205, 2004.
- KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, p.18-33, 1998.
- KIM, S.; SHIVANAND, T.; PODILA, G. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**, v.103, n.2, p.168-172, 1999.
- KOZAK, M. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. **Nature**, v. 308, p. 241-246, 1984.
- KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Research**, v.15 n.20, p.8125-48, 1987.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v.157, p.105, 1982.
- LAGRANGE, H.; JAY-ALLGMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus roots exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. **New Phytologist**, v.149, p.349-355, 2001.
- LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R. D.; KUYPER, T. W.; BREEMEN N. V. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from mineral. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n.5, p.248-254, 2001.
- LAPEYRIE, F.; PICATTO, C.; GERARD, J.; DEXHEIMER, J. T.E.M. study of intracellular and extracellular calcium oxalate accumulation by ectomycorrhizal fungi in pure culture or in association with *Eucalyptus* seedlings. **Symbiosis**, v.2, p.163-166, 1990.
- LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.342-346, 1991.
- LAURENT, P.; VOIBLET, C.; TAGU, D.; CARVALHO, D.; NEHLS, U.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; BAUW, G.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.10, p.862-871, 1999.

- LEI, J.; LAPEYERIE, F.; MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhizal formation. **New Phytologist**, v.116, p.115-122, 1990.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D. P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.659-673, 2005.
- LIMA, W. P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. 2.ed. São Paulo, Brazil: EDUSP, 1993. 301p.
- MAGATON, A. S.; PILO-VELOSO, D.; COLODETTE, J. L. Caracterização das *O*-acetil-(4-*O*-metilglicurono)xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova** [online], v.31, n.5, p.1085-1088, 2008.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.159, p.89-102, 1994.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signal and communication genes. **New Phytologist**, v.151, p.145-154, 2001.
- MARTIN, F.M.; HILBERT, J.L. Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. **Experientia**, v.47, p.321-331, 1991.
- MARTIN, F.; LAURENT, P.; CARVALHO, D.; VOIBLET, C.; BALESTRINI, R.; BOFANTE, P.; TAGU, D. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.161-174, 1999.
- MARTIN, F.; TAGU, D. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In: VARMA, A. K., HOCK, B. eds. **Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology**. 2ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 51-73, 1999.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRE'N, D.; BRUN, A.; DANCHIN, E.G.J.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.;

- SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUE'E, M.; BROKSTEIN, P.; CANBECK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.M.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.C.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; TACHET, L. F.; LUCIC, E.; KLETT, P.F.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBE', J.; LIN, Y.C.; LEGUE', V.; LE TACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; HIRZEL, H.N.; LE SECQ, M.P.O.; PETER, M.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KUES, U.; LUCAS, S.; PEER, Y.V.; PODILA, G.K.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.M.; ROUZE, P.; SANDERS, I.R.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I.V. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v.452, p.88-92, 2008.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, p.153-163, 1969.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.10, p.426-434, 1972.
- MARX, D. H.; RUEHLE, J. L.; CORDELL, C. E. **Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza**. In: Methods in Microbiology., Ed. NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. Academic Press, Londres. v.23, p.383-411, 1991.
- MARX, D. H.; CORDELL, C. E. **The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices**. In: Biotecnology of fungi for improving plant growth. Ed J M Whipps & R D Lumsden. British Mycological Society, London. p.1-25, 1989.
- MARX, D. H.; CORDELL, C. E.; MAUL, S. B.; RUHELE, J. L. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculant formulations. **New Forests**, v.3, p.45-46, 1989.
- MELLO, A. H.; ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J., SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, V. L. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.16, p.293-301, 2006.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A. M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia Americana* L. **Current Genetics**, v.46, p.158-165, 2004.

- MILLER, C.O. Cytokinin production by mycorrhizal fungi. In: HACSKAYLO, E. (Ed.). **Mycorrhizae**, Washington: United States Government Printing Office, p. 168-174, 1971.
- MOLINA, R.; MASSICOTE, H.; TRAPPE, J.M. **Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications**. In: Allen MF (Eds), Mycorrhizal Functioning-anintegrative plant-fungal process.Chapman and Hall, NewYork, p.357-423, 1992.
- MONTEIRO, C. A.; ROSSI, N. M. M. The nucleation of microtubules in *Aspergillus nidulans* germlings. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.309-313, 1999.
- MOREL, M.; JACOB, C.; KOHLER, A.; JOHANSSON, T.; MARTIN, F.; CHARLOT, M.; BRUN, A. Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus* - *Petula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.382-391, 2005.
- NEHLS, U.; BOCK, A.; EINIG, W.; HAMPP, R. Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 741-747, 2001.
- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; ECKE, M.; HAMPP, R. Identification and expression analysis of two fungal cDNA regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. **New Phytologist**, v.144, p.195-202, 1999.
- NG, P.P.; COLE, A.L.J.; JAMERSON, P.; MCWHA, J.A. Cytokinin production by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.91, p.57-62, 1982.
- NIEMI, K.; VUORINEN, T.; ERNSTSEN, A.; HÄGGMAN, H. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. **Tree Physiology**, v. 22, p.1231-1239, 2002.
- OLIVEIRA, V. L.; ROSSI, M. J.; TARGHETTA, B. L. **Avanços na aplicação de ectomicorrizas**. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; Hélio Almeida Burity; Newton Pereira Stamford; Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. (Org.). Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. Guaíba: Agrolivros, v. , p.297-331, 2008.

- OLIVEIRA, V. L.; SCHMIDT, V. D .B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**, v.14, p.57-62, 1994.
- PALMIERI, F. Mitochondrial carrier proteins. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.346, p.48-54, 1994.
- PETER, M.; COURTY, P.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; MARTIN, F. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.159, p.117-129, 2003.
- PETERSON, R. L.; BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant Soil**, v.159, p.79-88, 1994.
- PHAN, L.; SCHOENFELD, L.W.; VÁLÁSEK, L.; NIELSEN, K. H.; HINNEBUSCH, A. G. A subcomplex of three eIF3 subunit binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome bind of mRNA tRNA^{met}. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.20, n.11, p.2954-2965, 2001.
- PODILA, G. K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J. H.; HYMES, M. J. Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant and Soil**, v.244, p.117-128, 2002.
- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. **Molecular Genetics and Genomics**, v.266, p.858-864, 2002.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICCHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.928, 2001.
- ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.175-181, 2002.
- RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.12, p.697-715, 1996.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, p.1413-1421, 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnologia do Solo. Fundamentos e Perspectivas**. ESAL/ FAEP, Lavras-Brasil, 1988. 236p.
- SLANKIS, V. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.437-457, 1974.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**, 2.ed. USA: Academic Press, p.605, 1997.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (São Paulo, SP). ANPEC apresenta os números de 93. **Silvicultura**, São Paulo, v. 54, p. 10-11, 1994.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (São Paulo, SP). Luiz Kaufmann: setor não aproveita seu potencial. **Silvicultura**, São Paulo, v. 69, p. 7-11, 1997.
- SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Studies on mycorrhizal fungi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.612-618, 2006.
- SUNDARAM, S.; KIM, S. J.; SUZUKI, H.; McQUATTIE, C. J.; HIREMATH, S. T.; PODILA, G. Isolation and characterization of a symbiosis-regulated *ras* from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.14, n.5, p.618-628, 2001.
- SVITKIN, Y. V.; PAUSE, A.; HAGHIGHAT, A.; PYRONNET, S.; WITHERELL, G.; BELSHAM, G. J.; SONENBERG, N. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. **RNA**, v.7, p.382-394, 2001.

- SZCZEPANECK, T.; LAZOWSKA, J. Replacement of two non-adjacent amino acid in the *S. cerevisiae* bi2 intron-incoded RNA maturase is sufficient to gain a homing-endonuclease activity. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.15, n.14, p.3758-3767, 1996.
- TAGU, D.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; DE VRIES, O. M. H.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**, v.149, p.127-135, 2001.
- TAGU, D.; LAPEYRIE, F.; MARTIN, F. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. **Plant and Soil**, v.244, p.97-105, 2002a.
- TAGU, D.; MARMEISSE, R.; BAILLET, Y.; RIVIERE, S.; PALIN, B.; BERNARDINI, F.; MEREAU, A.; GAY, G.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus* HydPt-1 gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporium*. **European journal histochemistry**, v.46, n.1, p.23-29, 2002b.
- TAGU, D.; MARTIN, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. **New Phytologist**, v.133, n.1, p.73-85, 1996.
- TAGU, D.; NASSE, B.; MARTIN, F. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. **Gene**, v.168, p.93-97, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2 ed Massachusetts: Publish Sunderland, Editora Sinauer Associades, p.719, 2006.
- TANG, P.S.; LOO, S.W. Tests on after-effects of auxin seed treatment. **American Journal of Botany**, v.27, n.6, p.385-386, 1940.
- THOMSON, B. D.; GROVE, T. S.; MALAJCZUK, N.; HARDY, G. E. St. J. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi to increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. **New Phytologist**, v.126, p.517-524, 1994.

- TIBBETT, M.; SANDERS, F.E.; CAIRNEY, J.W.G. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture. **Mycological Research**, v.102, p.129-135, 1998.
- TIMONEN, S.; PETERSON, L. Cytoskeletons in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.244, p.199-210, 2002.
- TIMONEN S.; SÖDERSTRÖM, B.; RAUDASKOSKI, M. Dynamics of cytoskeletal proteins in developing pine ectomycorrhiza. **Mycorrhiza**, v.6, p.423-429, 1996.
- VIEIRA, H. E. E. **Ectomicorrizas e os genes envolvidos na simbiose**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia (Monografia), 62 p., 2008.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, L.; MARTIN, F. Identifications of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **The Plant Journal**, v.25, p.181-191, 2001.
- WILCOX, H. E. **Mycorrhizal Associations**. In Biotechnology of Plant-Microbe Interactions. Ed. J P Nakas & C Hagedorn. pp. 227-255. McGraw-Hill, New York, 1990
- WÖSTEN, H. A. B.; VOCHT, M. L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.79-86, 2000.
- WRIGHT, D. P.; JOHANSSON, T.; LE QUÉRE, A.; SÖRDERSTRÖM, B. TUNLID, A. Spatial patterns of gene expression in the extramatrical mycelium and mycorrhizal roots tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. **New Phytologist**, v.167, p.579-596, 2005.
- WULLSCHLEGERH, S.D.; REID, C.P.P. Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **New Phytologist**, v.116, p.681-688, 1990.
- YUN, W.; HALL, R. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.1063-1073, 2004.