

**MAÍRA DE FREITAS PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A  
PROTEÍNA RAS E O FATOR DE ELONGAÇÃO EF1 $\alpha$  EM  
ECTOMICORRIZAS DE *Scleroderma laeve* E *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**MAÍRA DE FREITAS PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM A  
PROTEÍNA RAS E O FATOR DE ELONGAÇÃO EF1 $\alpha$  EM  
ECTOMICORRIZAS DE *Scleroderma laeve* E *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

Aprovada: 18 de julho de 2011.

---

Prof<sup>ª</sup>. Marisa Vieira de Queiroz  
(Coorientadora)

---

Prof. Maurício Dutra Costa  
(Coorientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Denise Mara Soares Bazzolli

---

Prof. Olinto Liparini Pereira

---

Prof<sup>ª</sup>. Elza Fernandes de Araújo  
(Orientadora)

A Deus, por todo amor, fidelidade e cuidados  
incondicionais a minha vida!

-Ofereço-

Aos meus pais, pelo amor, compreensão,  
apoio e por toda confiança depositada em  
mim ao acreditarem que os meus sonhos  
se tornariam realidade.

-Dedico-

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pelo acolhimento e pelo incentivo acadêmico.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

À professora Elza Fernandes Araújo, pela orientação, pela confiança e pelos inúmeros ensinamentos e incentivos ao longo do curso.

Aos professores, Marisa Vieira de Queiroz e Maurício Dutra Costa pela amizade, pela confiança, pelo apoio e pela constante colaboração neste trabalho.

A professora Denise Mara Soares Bazzoli, pela amizade, pelo carinho, pela atenção e pelas conversas agradáveis, além da participação na banca examinadora.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, pelas valiosas contribuições e pela participação na banca examinadora.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela compreensão e pelos ensinamentos ao longo do curso.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Danilo, Evandro, Paulo, Nilcéa e Bete, pelos auxílios prestados a todos.

À Blanca, pela ajuda imprescindível durante a condução dos experimentos, pelo companheirismo e pelo apoio sempre.

À Mariane, ao Fábio, à Ireninha e à Janaina pelos ensinamentos, companheirismo, amizade e auxílio no decorrer dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos, pelo convívio, pelo apoio e pelos momentos agradáveis durante esse período.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas, pelo apoio e pela amizade durante a realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial ao Cléber, pela ajuda e pela paciência durante a condução dos experimentos.

Às queridas Jaque e Regina, por todas as ajudas, pelas conversas e por manter o laboratório tão organizado.

A todos os amigos dos outros laboratórios do Departamento de Microbiologia.

Aos meus queridos amigos, Ciro e Solimar, pela amizade, pelas conversas agradáveis, pelo incentivo, pelo carinho, pela paciência e pelas boas risadas. Vocês estão para sempre no meu coração!

Aos amigos da Igreja do Evangelho Quadrangular pela recepção, pelo apoio e pelo carinho sempre.

À minha querida Cássia, pelo acolhimento, pela amizade, pelo companheirismo e pelos agradáveis momentos compartilhados em nossa casa.

Aos meus amigos de Lafaiete e de Sete Lagoas que mesmo com a distância e o tempo, provaram que a amizade não acaba!

Ao Fábio, agradeço por todo amor, pelo carinho e pela compreensão.

À minha família, por compreender a minha ausência nesse período.

As minhas queridas irmãs, Mariane e Isabela, pelo carinho sempre e por entenderem a minha ausência nesse período.

Aos meus pais por todo amor, pelo carinho e pela compreensão.

E acima de tudo a Deus, pelo amor e por guardar a minha vida e guiar os meus passos. "Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!" (Rm 11.36).

## **BIOGRAFIA**

Maíra de Freitas Pereira, filha de Ivan Rodrigues Pereira e Maria Celeste de Freitas, nasceu em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, no dia 14 de agosto de 1985. Em março de 2003 ingressou na Universidade Presidente Antônio Carlos em Barbacena, Minas Gerais, graduando-se, janeiro de 2007, em Biotecnologia. Em agosto de 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. Obtenção do fungo ectomicorrízico.....	16
3.2. Condições de cultivo do fungo ectomicorrízico .....	16
3.3. Estabelecimento da micorrização entre <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> <i>in vitro</i> .....	17
3.3.1. Desinfestação de sementes .....	17
3.3.2. Micorrização <i>in vitro</i> - Pré-simbiose .....	17
3.3.3. Micorrização <i>in vitro</i> – Simbiose .....	18
3.3.4. Avaliação das ectomicorrizas de <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	20
3.4. Isolamento e sequenciamento de genes em <i>Scleroderma laeve</i> .....	20
3.4.1. Extração de DNA total.....	20
3.4.2. Amplificações das sequências que correspondem aos genes <i>ras</i> , <i>ef1<math>\alpha</math></i> e rDNA 17S .....	21
3.4.3. Anotações das sequências obtidas .....	23

3.5. Análise da expressão dos genes <i>ras</i> e <i>efl<math>\alpha</math></i> por RT-PCR em ectomicorrizas de <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	24
3.5.1. Extração de RNA total.....	24
3.5.2. Análise da expressão por RT-PCR.....	25
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Estabelecimento da interação entre <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> e avaliação morfológica das raízes durante as fases de formação das ectomicorrizas.....	27
4.2. Isolamento das sequências parciais dos genes, <i>ras</i> , <i>efl<math>\alpha</math></i> e rDNA 17S de <i>Scleroderma laeve</i> .....	32
4.3. Avaliação da expressão dos genes <i>ras</i> e <i>efl<math>\alpha</math></i> por RT-PCR nas diferentes fases da associação ectomicorrízica entre <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	40
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

PEREIRA, Maíra de Freitas, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Avaliação da expressão dos genes que codificam a proteína RAS e o fator de alongação EF1 $\alpha$  em ectomicorrizas de *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Coorientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Maurício Dutra Costa.

A associação ectomicorrízica é uma interação mutualista entre raízes de plantas e fungos do solo, resultando em mudanças morfofisiológicas do sistema radicular das plantas. Os benefícios nutricionais advêm da capacidade do fungo em aumentar a absorção de nutrientes minerais pelas plantas, recebendo em troca os fotoassimilados. Na associação entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis* ainda não se tem informações de quais genes são decisivos e estão relacionados a este processo. Transcritos dos genes *ras* e *ef1 $\alpha$*  foram identificados durante a formação da simbiose e sendo diferencialmente expressos na associação ectomicorrízica, e estão relacionados a vias de transdução de sinal e atuando na síntese protéica, respectivamente. Assim, os objetivos deste trabalho foram estabelecer a associação ectomicorrízica *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*, isolar sequências parciais dos genes *ras* e *ef1 $\alpha$*  do fungo ectomicorrízico *S. laeve*, e avaliar a expressão funcional destes genes durante as fases de formação das ectomicorrizas. Este trabalho comprova a associação *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*, sendo registrada pela primeira vez. As estruturas típicas das ectomicorrizas, como a formação do manto fúngico e da rede de Hartig foram observadas. Nos tempos avaliados, em três dias de contato já havia a formação do manto fúngico. Aos 15 dias, o manto fúngico estava completamente formado, as células da epiderme alongadas e a rede de Hartig, em formação. Aos 30 dias, as ectomicorrizas apresentavam todas as estruturas típicas

desenvolvidas. Para avaliar a expressão dos genes durante a associação, sequências parciais dos genes *ras* e *eflα* foram isolados, e os transcritos destes genes foram avaliados na fase pré-simbiótica e aos três, 15 e 30 dias após o contato físico. Os transcritos do gene *eflα* foram expressos durante todos os tempos avaliados. Os transcritos do gene *ras* foram detectados nas ectomicorrizas após três, 15 e 30 dias. Estes resultados são fundamentais para uma melhor compreensão da associação ectomicorrízica entre *S. laeve* e *E. grandis* e sugerem que as vias de transdução de sinais mediada por *ras* podem ser funcionais durante o estabelecimento da simbiose entre os fungos e as raízes de plantas.

## ABSTRACT

PEREIRA, Maíra de Freitas, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2011. **Expression analysis of the genes that code for RAS and the elongation factor EF1 $\alpha$  in *Scleroderma laeve* and *Eucalyptus grandis* ectomycorrhizas.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Maurício Dutra Costa.

The ectomycorrhizal association is a mutualistic interaction between plant roots and soil fungi that causes morphophysiological changes in the plant root system. The nutritional benefits result from the capacity of the fungus to increase the uptake of mineral nutrients by the host plant in exchange for photoassimilates. For the ectomycorrhizal association between *Scleroderma laeve* and *Eucalyptus grandis*, there is no information on which genes are decisive for the symbiosis and how they relate to the formation of ectomycorrhizas. Transcripts of the genes *ras* and *ef1- $\alpha$*  were identified as differentially expressed in many symbiotic associations and are related to signal transduction pathways and protein synthesis, respectively. Thus, the objectives of this work were to establish the ectomycorrhizal association between *S. laeve* and *E. grandis in vitro*, to isolate partial sequences of the genes *ras* and *ef1- $\alpha$*  of *S. laeve*, and to evaluate the functional expression of these genes during ectomycorrhizal formation. Our work demonstrates the ectomycorrhizal association between *S. laeve* and *E. grandis in vitro* for the first time. The typical structures of ectomycorrhizas, such as the mantle and the Hartig net, were observed. At three days of contact between *S. laeve* and *E. grandis* roots the beginning of mantle formation could be observed. At 15 days, the mantle was completely formed, the epidermal cells were elongated, and the Hartig net formation was in progress. At 30 days, the ectomycorrhizas presented all the typical morphological structures fully developed.

To evaluate gene expression during the association, partial sequences of *ras* and *efl- $\alpha$*  were isolated and the transcripts evaluated at the pre-symbiotic phase and at 3, 15 and 30 days after physical contact of the fungus with the plant roots. The transcripts of the gene *efl- $\alpha$*  were expressed at all evaluated times. Transcripts of *ras* were only detected in the ectomycorrhizas after three, 15, and 30 days of contact. These results are fundamental for a better understanding of the ectomycorrhizal association between *S. laeve* and *E. grandis* and suggest that *ras*-mediated signal transduction pathways may be functional during the establishment of the symbiosis between the fungus and the host roots.

## 1. INTRODUÇÃO

A associação ectomicorrízica é a interação mutualista entre fungos do solo e raízes de plantas arbóreas, caracterizada pela existência de um manto de hifas fúngicas ao redor das raízes e da rede de Hartig nos espaços intracelulares da epiderme e do córtex radicular. O fungo recebe carbono oriundo dos fotoassimilados da planta e em contrapartida, a planta recebe água e nutrientes minerais oriundos do solo. Além dos benefícios nutricionais, o fungo promove proteção da planta contra os patógenos presentes no solo, como também, a condições ambientais adversas (Brundrett et al., 1996; Smith & Read, 2008).

Vários gêneros de fungos formam associação ectomicorrízica. Neste contexto, fungos do gênero *Scleroderma*, basidiomiceto pertencente à família Sclerodermataceae são encontrados em abundância e distribuídos em regiões tropicais e temperadas (Sims et al., 1997; Mello et al., 2006). Este fungo foi encontrado no Brasil em várias regiões de florestas de eucaliptos e pinhos (Coelho et al., 1997; Campos, 2004; Giachini et al., 2004; Souza et al., 2006; Cortez et al., 2008; Cortez et al., 2011). Os fungos pertencentes a este gênero têm sido aplicados como inoculantes em espécies vegetais de interesse econômico, como o eucalipto, aumentando a sustentabilidade das plantações (Sims et al., 1997; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007; Sanon et al., 2009). Vários trabalhos relatam a formação de ectomicorrizas *in vitro* ou em campo, mas não são encontrados estudos de como ocorre a associação entre *Scleroderma - Eucalyptus in vitro*. A síntese *in vitro* tem sido aliada aos estudos de avaliação funcional de genes, permitindo o acompanhamento das alterações morfológicas e então, a detecção de genes envolvidos durante este processo. Entre os genes que apresentam expressão

diferencial em ectomicorrizas encontra-se os que codificam para GTPases. A hidrólise do GTP é uma reação fundamental na célula e controla numerosos processos vitais, como a biossíntese de proteínas, crescimento e diferenciação celular, vias de transdução de sinais, translocação de proteínas e transporte de vesículas (Scheffzek & Ahmadian, 2005). Entre os genes envolvidos com estes processos celulares foram selecionados os que codificam para a proteína RAS e os fatores de alongação. As proteínas RAS são pertencente as vias de transdução de sinais, controlando eventos como a progressão do ciclo e da divisão celular e os fatores de alongação EF1 $\alpha$  atuam na síntese proteica durante o alongamento da cadeia polipeptídica, auxiliando a ligação do tRNA carregado ao sítio A do ribossomo (Bourne et al., 1990; Sundaram et al., 2001; Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005). O estabelecimento da associação entre *S. laeve* e *E. grandis in vitro* e a avaliação destes genes durante a interação é o primeiro passo para o entendimento dessa associação, de modo que este conhecimento auxiliará na compreensão de como estes atuam durante as alterações morfológicas que ocorrem na associação ectomicorrízica.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer e analisar pela primeira vez *in vitro* a associação ectomicorrízica entre *S. laeve* e *E. grandis*, isolar sequências parciais dos genes *ras* e *ef1 $\alpha$*  do fungo ectomicorrízico *S. laeve* e avaliar a expressão destes genes durante a fase pré simbiótica e em três, 15 e 30 dias após o contato físico entre *S. laeve* e *E. grandis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

As micorrizas são associações simbióticas entre fungos do solo e raízes de plantas. Aproximadamente 82 % das plantas vasculares terrestres conhecidas formam algum tipo de associação micorrízica. Atualmente são reconhecidos sete tipos de micorrizas: as arbusculares (MA); as ectomicorrizas (ECM); as ectendomicorrizas; as orquidóides; as ericóides; as monotropóides e as arbutóides (Smith & Read, 2008). Algumas possuem características morfológicas similares entre si. No entanto, devido a suas histórias evolutivas são caracterizadas separadamente. As micorrizas arbusculares e ectomicorrizas são os tipos de micorrizas mais abundantes e as demais são restritas a determinadas famílias de plantas (Brundrett, 2002; Peterson et al., 2003; Brundrett, 2009).

Dentre as características morfológicas das ectomicorrizas são observadas a presença de três estruturas: o manto fúngico que recobre as raízes; a rede de Hartig, formada por hifas que penetram entre as células epidérmicas e corticais das raízes; e um sistema composto por filamentos de hifas que emanam em direção ao solo e que são essenciais para conectar as ectomicorrizas aos corpos de frutificação (Smith & Read, 2008).

A interação simbiótica é eficiente em promover benefícios nutricionais devido à prospecção do solo pelo micélio fúngico, que retira do solo os nutrientes minerais não disponíveis diretamente às plantas, como o nitrogênio e o fósforo. Em troca, as plantas fornecem fotoassimilados ao fungo (Martin et al., 2007; Smith & Read, 2008). Essa troca de metabólitos é essencial para a sobrevivência de ambos os simbioss, principalmente em ambientes com solos pobres, desempenhando

importante papel na estabilidade dos ecossistemas florestais (Tagu et al., 2002). Outros benefícios ocorrem nas raízes colonizadas, tais como a maior tolerância à distúrbios ambientais gerados pela utilização de compostos químicos (herbicidas), à tolerância aos patógenos, a metais pesados, a estresses hídricos, a altas temperaturas, salinidade, à acidez do solo, além de aumentar o transporte de água e contribuir para agregação das partículas do solo (Sawyer et al., 2003; Glowa et al., 2003; Smith & Read, 2008; Krpata et al., 2008; Tedersoo et al., 2010).

Estima-se que existam entre 20000 a 25000 espécies de fungos ectomicorrízicos distribuídas entre os filos Basidiomycota, Ascomycota e Glomeromycota (Rinaldi et al., 2008; Smith & Read, 2008; Tedersoo et al., 2010). Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota representam cerca e 95 % dos fungos capazes de formar associação ectomicorrízica. Os fungos do filo Ascomycota representam 4,8 % e apenas um representante do Filo Glomeromycota, pertencente ao gênero *Endogone* é capaz de formar a associação. No entanto, alguns trabalhos citam alguns heterobasidiomicetos, pertencentes à família Sebacinaceae como sendo capazes de formar ectomicorrizas, micorrizas orquidóides e micorrizas ericóides (Weiss et al., 2004; Taylor & Alexander, 2005; Bonfante & Anca, 2009).

Os fungos ectomicorrízicos podem associar-se simbioticamente com 3 % das fanerógamas e com 90 % das espécies florestais em regiões temperadas (Smith & Read, 2008). As espécies vegetais colonizadas por esses fungos são, principalmente, espécies arbóreas utilizadas na indústria de madeira, da celulose e do carvão (Costa et al., 2002).

Entre as principais famílias de plantas colonizadas por fungos ectomicorrízicos estão: Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Nothofagaceae, Myrtaceae, Dipterocarpaceae, Caesalpiniaceae e Salicaceae. Essas famílias são dominantes em florestas boreais no Mediterrâneo, florestas tropicais e temperadas na Austrália, no Hemisfério Norte, na América do Sul, na África e na Índia. Também são encontradas nas regiões de florestas indo malaia e em regiões de savanas. Essas informações mostram o quanto as plantas colonizadas pelos fungos ectomicorrízicos estão amplamente distribuídas pelo mundo (Tedersoo et al., 2010).

As associações ectomicorrízicas comumente apresentam especificidade fungo-hospedeiro, podendo ser em nível de gênero ou em alguns casos, até mesmo entre espécies vegetais (Malajczuk et al., 1982; Oliveira et al., 1994; Costa et al., 2002; Pereira et al., 2005). Os primeiros estudos realizados por Malajczuk et al.

(1982) mostraram poucas diferenças na capacidade de formar ectomicorrizas entre diferentes espécies de *Eucalyptus* de regiões geograficamente distintas com diversos fungos, incluindo *Pisolithus*, *Scleroderma* e *Laccaria*. Testes realizados com 31 isolados de *Pisolithus* sp., originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros, mostraram grande variação na colonização das raízes de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus urophylla* (Pereira et al., 2005). Em condições artificiais de laboratório, a formação de micorrizas *in vitro* pode ser realizada por vários fungos ectomicorrízicos em associação com diferentes hospedeiros. Entretanto as ectomicorrizas podem apresentar-se menos desenvolvidas quando comparadas a ectomicorrizas obtidas a partir de isolados tipicamente associados ao hospedeiro no campo (Costa et al., 2002).

Espécies do gênero *Scleroderma* pertencem a ordem Sclerodermatales, que inclui quatro famílias bem definidas: Sclerodermataceae, Astraceae, Broomeiaceae e Pisolithaceae (Chambers & Cairney 1999). As espécies fúngicas desse gênero são encontradas em regiões temperadas e tropicais em todo o mundo, sendo descritas 176 diferentes espécies e subespécies do gênero *Scleroderma* (Sims et al., 1997; Sims et al., 1999; Chambers & Cairney 1999; Index Fungorum, 2011). O gênero *Scleroderma* é bem difundido, sendo encontrado como saprófita no solo e/ou madeira em decomposição, ou em associação ectomicorrízica com espécies importantes para o setor florestal (Guzmán., 1970; Giachini et al., 2004; Phosri et al., 2009). Os fungos do gênero *Scleroderma* formam ectomicorrizas brancas e abundantes cordões miceliais (Chambers & Cairney, 1999).

A ocorrência de fungos do gênero *Scleroderma* no Brasil são relatados em florestas de *Eucalyptus* e *Pinus* nas regiões sul, nordeste e sudeste (Guimarães, 1993; Coelho et al., 1997; Campos, 2004; Giachini et al., 2004; Cortez et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Cortez et al., 2011). No entanto, no estado de São Paulo relata-se interação ectomicorrízica desse fungo com *Caryocar brasiliense* Camb. espécie nativa da região do Cerrado (Baseia & Milanez, 2000). A formação da associação ectomicorrízica com outras espécies vegetais também é relatada em *Acacia* (Fabaceae), *Gomidesia*, *Coccoloba* e *Carya illinoensis* (noz pecã) (Ribeiro, 2001; Cortez et al., 2008; Oliveira et al., 2010).

Os fungos do gênero *Scleroderma* e *Pisolithus* têm sido introduzidos em programas de inoculação em habitats perturbados, auxiliando no desenvolvimento de plântulas de eucaliptos (Lu et al., 1998). No entanto, na China, os esporos de

*Scleroderma* não têm sido utilizados nos programas de inoculação devido ao pouco conhecimento sobre as espécies hospedeiras e a compatibilidade para a formação da associação ectomicorrízica por este gênero (Chen et al.,2006). Em plantações de eucaliptos e pinhos no qual foram testadas a capacidade de associar simbioticamente, as ectomicorrizas formadas pelo gênero *Scleroderma* foram eficazes na promoção e crescimento das árvores, a maior tolerância as condições ambientais adversas e ao melhoramento na ciclagem de nutrientes (Chen et al.,2006).

A confirmação da capacidade de formação da associação ectomicorrízica de uma dada espécie fúngica é feita pela observação das conexões entre as hifas do fungo com o sistema radicular, pela análise microscópica das estruturas das ectomicorrizas obtidas no campo ou pela técnica de síntese *in vitro* (Brun et al., 1995; Brundrett et al., 1996; Burgess et al., 1996). O tempo necessário para cada fase do desenvolvimento das ectomicorrizas é variável e dependente da compatibilidade entre a planta e o fungo, além da interferência dos fatores bióticos e abióticos e o método utilizado para a síntese *in vitro*, sendo que esses fatores podem influenciar todo o processo (Smith & Read, 2008).

A formação das ectomicorrizas é o processo caracterizado pela sucessão regulada de modificações morfológicas durante a colonização da raiz pela hifa do fungo. As fases de formação das ectomicorrizas podem ser denominadas pré-infecção, colonização, diferenciação e funcionamento (Martin & Tagu, 1999).

Antes do contato físico entre o fungo e as raízes das plantas hospedeiras, compostos produzidos pelos simbiossiontes ativam respostas nos respectivos hospedeiros. Os exsudados radiculares são capazes de induzir a germinação dos esporos e as hifas parecem reconhecer o sistema radicular devido a alterações nutricionais, como a depleção de nitrogênio que ocorrem na rizosfera. Experimentos com quatro espécies de fungos ectomicorrízicos do gênero *Suillus*, mostraram que a germinação de esporos foi induzida pela exposição destes à exsudados radiculares de *Pinus* (Martin & Hilbert, 1999). A absorção de nitrogênio realizada pelas raízes e a secreção de açúcares da planta hospedeira transformam o ambiente, de forma que ocorra a diminuição das concentrações de nitrogênio e um aumento nas concentrações de compostos ricos em carbono. Essas alterações podem representar sinais tróficos para a percepção dos fungos simbiossiontes pelas raízes das plantas, fungos saprófitas ou patogênicos (Martin et al., 2001; Perez-Garcia et al., 2001; Tagu et al., 2002).

Esses sinais moleculares são trocados na rizosfera entre os simbioss e, além da germinação dos esporos, induz o crescimento micelial (Tagu et al., 2002). Entre as substâncias secretadas pelas raízes é relatado a liberação de flavonóides, diterpenes, hormônios e vários nutrientes (Martin et al., 2001). Foi observado que estes compostos induzem modificações morfológicas nas hifas fúngicas, a exemplo do ângulo de ramificação das hifas. Os fungos ectomicorrízicos também produzem moléculas sinais nas primeiras fases do desenvolvimento da associação, tais como a hipaforinas, que induzem alterações morfológicas nas raízes, inibindo a formação dos pêlos radiculares (Martin et al., 2001; Tagu et al., 2002). As hipaforinas compreendem o maior grupo de alcalóides indólicos presentes nos micélios e exsudados de *Pisolithus tinctorius* (Beguiristain et al., 1995).

Os fungos ectomicorrízicos são capazes de produzir hormônios. As auxinas fúngicas possuem importante papel como sinalizadoras na formação e funcionamento das ectomicorrizas (Martin et al., 2001). O efeito das auxinas na rizogênese pode ser interpretado como preparação do sistema radicular para a colonização eficiente, sendo que em baixas concentrações, estimulam o crescimento da raiz e a formação de novas raízes laterais, sendo sítios de colonização pelas hifas de fungos ectomicorrízicos (Ditengou & Lapeyrie, 2000; Martin et al., 2001). A inoculação de *Pinus* com mutantes de *Hebeloma cylindrosporum* com alta capacidade de produzir auxinas, apresentou aumento no número de ectomicorrizas formadas (Gay et al., 1994).

Após a fase pré-simbiótica, as hifas atingem a superfície das raízes, induzindo rapidamente a ramificação das hifas fúngicas, quando se dá o início do processo de colonização. As hifas em contato com a parede celular vegetal aumentam o seu tamanho e aderem firmemente às raízes. Essas alterações são acompanhadas pelo aumento da divisão celular. Esse evento é provavelmente induzido pela liberação de exsudados e é acompanhado pela colonização da superfície radicular, inibindo os pêlos radiculares pré-existentes. As adesinas, lectinas e hidrofobinas são pequenas proteínas liberadas pelo fungo, que são depositadas entre as hifas adjacentes, auxiliando na agregação e formação do manto fúngico (Hilbert et al., 1991; Martin & Tagu, 1999; Tagu et al., 2002).

Após o início da formação do manto fúngico, as hifas multiplicam-se para formar uma série de camadas que irão se diferenciar em um manto maduro (Martin et al., 2001). Com o manto fúngico totalmente formado, as hifas fúngicas penetram

entre as células epidérmicas e corticais, formando a rede de Hartig, sendo esta etapa denominada diferenciação. Durante a penetração das hifas, as células das raízes alteram a orientação de crescimento, com a alongação das células epidérmicas, devido às alterações que ocorrem no citoesqueleto (Martin & Tagu, 1999; Tagu et al., 2002). As células fúngicas tornam-se multinucleadas e ricas em mitocôndrias e retículo endoplasmático, indicando alta atividade metabólica (Massicote et al., 1987).

Além das mudanças morfológicas e fisiológicas durante a formação das ectomicorrizas, ocorrem alterações na expressão dos genes em ambos os simbiontes (Martin et al., 2001; Voiblet et al., 2001). A caracterização dos genes expressos durante as diferentes fases da associação têm demonstrado a diversidade dos processos moleculares envolvidos. Os genes podem ser ativados ou reprimidos, dependendo da fase de desenvolvimento. O controle desses processos é essencial para a formação das ectomicorrizas. A identificação de genes expressos exclusivamente ou predominantemente na simbiose auxilia na compreensão do desenvolvimento das ectomicorrizas (Martin et al., 2001; Voiblet et al., 2001; Brundrett, 2004; Smith & Read, 2008).

Para os estudos da expressão gênica durante as fases da associação micorrízica, diferentes condições experimentais e técnicas para análises dos transcritos têm sido utilizadas. Os genes diferencialmente expressos durante a associação podem ser identificados e analisados por meio de técnicas como microarranjos, DDRT-PCR, hibridização supressiva subtrativa, entre outras ( Kim et al., 1998; Podila et al., 2002; Peter et al., 2003; Kruger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Acioli-Santos et al., 2008; Coelho et al., 2010).

A identificação de genes diferencialmente expressos, envolvidos com o metabolismo celular ou mesmo genes exclusivos da simbiose, contribui para a elucidação molecular e fisiológica do desenvolvimento das ectomicorrizas (Martin et al., 2001; Voiblet et al., 2001; Brundrett, 2004; Smith & Read, 2008). Diferentes trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando diferentes fungos e hospedeiros, como as associações entre *Laccaria-Pinus*, *Tuber-Tilia*, *Pisolithus-Castanea*, *Terfezia-Cistus*, *Piloderma-Quercus*, *Pisolithus-Eucalyptus*, *Paxilus-Betula* e *Hydnangium-Eucalyptus*; sendo a expressão dos genes avaliada durante as fases da formação das ectomicorrizas (Podila et al., 2002; Menotta et al., 2004; Kruger et al., 2004;

Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Acioli-Santos et al., 2008; Coelho et al., 2010).

São poucos os trabalhos sobre os eventos moleculares que ocorrem nas fases de formação das micorrizas que envolvem o contato físico, devido à dificuldade no desenvolvimento sincronizado entre os dois simbiontes (Weidmann et al., 2004).

Durante a fase pré-simbiótica, os fungos e plantas reorientam os seus processos metabólicos para facilitar a formação e funcionamento da associação ectomicorrízica. Essas funções requerem alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e alterações na morfologia, que são coordenadas pelas trocas de sinais entre os simbiontes (Martin et al., 2001; Podila et al., 2002; Kruger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Harrison, 2005; Zaretsky et al., 2006; Acioli-Santos et al., 2008; Coelho et al., 2010).

Na fase pré-simbiótica foram ativados genes relacionados com as vias de transdução de sinais, metabolismo primário, transcrição e síntese protéica, transporte e resposta a estresses (Podila et al. 2002; Menotta et al. 2004; Acioli-Santos et al., 2008; Coelho et al., 2010). Durante as primeiras horas da associação entre *Pinus* e *Laccaria bicolor*, o gene que codifica para a enzima álcool desidrogenase foi detectado, sendo relacionada com o processamento dos exsudados radiculares pelo fungo (Podila et al., 2002). Na associação entre *Tuber-Tilia* foram identificados vários genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo energético e transporte nuclear como a COX1, envolvida no transporte de proteínas para as mitocôndrias, sugerindo o aumento da atividade mitocondrial nessa fase (Menotta et al., 2004). Estudos feitos com *Gigaspora rosea*, fungo micorrízico arbuscular, mostraram resposta fúngica rápida quando na presença de exsudados radiculares, ativando a expressão de genes que codificam proteínas mitocondriais, sugerindo também aumentos na respiração mitocondrial e no consumo de oxigênio durante a fase pré-simbiótica (Harrison, 2005).

Durante as 12 primeiras horas da associação entre *Pisolithus tinctorius* e *Castanea sativa*, genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos foram expressos em altos níveis, sugerindo que nesse curto período de tempo o acúmulo de aminoácidos a exemplo da metionina, é necessário para a síntese protéica durante a fase de funcionamento da associação ectomicorrízica (Acioli-Santos et al., 2008). Na associação entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis*, para confirmar os genes diferencialmente expressos obtidos pela biblioteca subtrativa supressiva, cinco genes

foram selecionados e os transcritos avaliados pela técnica de RT-qPCR. Entre esses genes, o que codifica a ATP sintase foi seis vezes mais expresso e o gene que codifica uma hidrofobina foi uma vez mais expresso, quando comparado o micélio cultivado na presença da planta com o micélio em vida livre (Coelho et al., 2010). Na associação entre *Piloderma* e *Quercus* foram identificados genes sendo diferencialmente expressos na planta mas, não foram encontrados genes específicos da simbiose sendo expressos no tecido vegetal. Os genes identificados estão envolvidos nas vias de transdução de sinais, resposta a estresse, proteínas inibidores de apoptose, proteínas envolvidas no reconhecimento, metabolismo e crescimento celular (Kruger et al., 2004).

Durante as fases de colonização e diferenciação das ectomicorrizas a alteração na expressão de genes envolvidos na proliferação e divisão celular, sinalização e diferenciação, síntese da parede celular e matriz celular, respostas de defesa ou a estresse, metabolismo primário (glicólise, biossíntese de aminoácidos, etc.) e a atividade de transportadores tem sido observada (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005).

Na associação entre *P. microcarpus* e *E. globulus*, as alterações na expressão gênica do fungo e da planta foram associadas com as alterações morfológicas que ocorrem durante a formação das ectomicorrizas. Foram identificados 844 genes do fungo e 132 da planta, sendo divididos em sete grupos referentes à resposta transcricional, durante quatro, sete, 12 e 21 dias de associação. Aos 12 dias, o maior conjunto de genes expressos foram os envolvidos com a síntese protéica, atividade mitocondrial, vias de transdução de sinais e fatores de transcrição. Um segundo grupo contendo 47 ESTs de *Pisolithus* diferencialmente expressas no quarto dia de associação foram considerados candidatos para o desenvolvimento inicial da simbiose, contendo genes para as hidrofobinas e as manoproteínas. No entanto, genes específicos da simbiose não foram detectados nessa análise. Em *Eucalyptus*, genes que codificam proteínas relacionadas com respostas de defesa e estresse foram diferencialmente expressos durante o início da associação (quatro dias) e genes envolvidos no metabolismo de hormônios foram detectados do quarto ao sétimo dia de associação (Duplessis et al., 2005).

Na associação *Paxillus involutus* *Betula pendula*, avaliou-se o perfil da expressão gênica do fungo e da planta, durante as quatro fases da associação ectomicorrízica. Foram identificados 251 genes do fungo e 138 genes da planta

sendo diferencialmente expressos durante o desenvolvimento ectomicorrízico. O perfil gênico do tecido vegetal mostrou aumento na expressão de genes relacionados com a resposta a estresse, durante a formação do manto fúngico e rede de Hartig e, nas fases mais tardias (funcionamento), esses genes foram reprimidos. Genes envolvidos no transporte de água pelo tecido vegetal também foram reprimidos durante as fases da associação (Le Queré et al., 2005). No fungo, ocorreram aumentos na expressão de genes que codificam transportadores de hexose e enzimas envolvidas na respiração mitocondrial, indicando a alta atividade metabólica pelo fungo no recebimento dos fotoassimilados transferidos pela planta. Esses resultados sugerem que a hexose é utilizada como a fonte de açúcar preferencial pelos fungos. Os resultados obtidos nessa associação foram similares com os resultados do perfil da expressão gênica durante a formação de ectomicorrizas entre *P. microcarpus* e *E. globulus*. Na literatura apenas essas duas associações apresentam o perfil da expressão gênica dos fungos e plantas, durante as quatro fases da associação ectomicorrízica (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005).

Após o estabelecimento funcional da associação ectomicorrízica foram detectados transcritos de genes relacionados ao transporte de hexoses entre *Amanita* e *Populus* (López et al., 2007; Nehls et al., 2010). As hidrofobinas também foram detectadas sendo reguladas na associação entre *Tricholoma terreum* e *Pinus sylvestris* durante a formação das micorrizas e desenvolvimento das hifas (Mankel et al., 2002). Durante a associação entre *Tuber-Tilia* foram detectadas a expressão de genes que codificam proteínas ribossomais, proteínas quinases, sorbitol desidrogenase, entre outros (Polidori et al., 2002).

A não detecção de transcritos de genes específicos da simbiose e a indução moderada de genes regulados pela associação sugerem que os programas metabólicos e ontogênicos que levam ao desenvolvimento da simbiose são dirigidos pela expressão diferencial de genes envolvidos no metabolismo celular ao todo pré-existente, mais do que pela expressão de genes específicos da simbiose (Martin et al., 2007).

Entre os genes pré-existentes do metabolismo celular encontram-se os que codificam para proteínas de hidrólise do GTP ou GTPases. A hidrólise do GTP é uma reação fundamental na célula e controla numerosos processos vitais, como a biossíntese de proteínas, crescimento e diferenciação celular, vias de transdução de sinais, translocação de proteínas e transporte de vesículas (Scheffzek & Ahmadian,

2005). Entre os genes pertencentes às vias de transdução de sinais, encontram-se os que codificam as proteínas RAS. As RAS são proteínas monoméricas de ligação ao GTP, com massa molecular entre 20 e 40 kDa. São funcionais a partir da fosforilação e estão presentes na maioria dos eucariotos, incluindo leveduras e mamíferos. Essas proteínas são reguladoras das vias de transdução de sinais, promovendo alterações adaptativas, progressão e divisão celular, defesa celular e estando também nos mecanismos de patogenicidade (Bourne et al., 1990; Waugh et al., 2002; Ha et al., 2003; Lammers, 2004). O gene que codifica RAS foi descrito em diferentes trabalhos sendo o mesmo expresso diferencialmente nas associações *L. bicolor* – *P. resinosa*, *P. microcarpus* – *E. globulus* e *P. involutus* – *B. pendula* (Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005). Em fungos ectomicorrízicos, o gene que codifica a RAS foi caracterizado apenas para *L. bicolor*. Possui 1,5 kb, cópia única e apenas 580 pb dessa sequência possui homologia com os genes *ras* de outros organismos (Sundaram et al., 2001). A expressão gênica de *ras* durante a associação entre *L. bicolor* e *Pinus resinosa* foi detectada 48 horas após a interação entre os simbiontes, em análises realizadas por Northern Blot. A expressão desse gene não foi detectada no micélio em vida livre, sugerindo que essa proteína está envolvida durante o desenvolvimento e manutenção das ectomicorrizas (Sundaram et al., 2001). Análises por Western Blot foram realizadas para confirmar os resultados da expressão gênica de *ras* em resposta aos elicitores ou sinais emitidos pelas raízes vegetais. Os resultados confirmaram a presença da proteína RAS localizada próxima a parede celular fúngica durante a formação da associação ectomicorrízica (Sundaram et al., 2001). No sistema *L. bicolor*-*P. resinosa*, durante a avaliação de transcritos diferencialmente expressos na fase pré-simbiótica, 13 % da população de transcritos estavam relacionados com as vias de transdução de sinais e aumentos na expressão do gene *ras* foram detectados nas hifas entre seis e 72 h durante a fase pré-simbiótica com *Pinus* (Podila et al., 2002).

Durante a associação entre *P. microcarpus* e *Eucalyptus globulus*, dois genes que codificam as proteínas RAS foram detectados por análises de microarranjos, durante os estudos do perfil gênico de ambos os simbiontes. O primeiro gene *ras* foi detectado em baixos níveis a partir do quarto dia de associação, tendo um aumento na expressão a partir do 12º dia de associação. A partir do 21º dia de associação ectomicorrízica a expressão foi menor. O segundo gene *ras* foi detectado em baixos níveis a partir do 7º dia de associação, a expressão foi aumentada a partir do 12º dia e

reduzida no tempo de 21º dia da associação ectomicorrízica. Esses resultados apresentam semelhanças nas respostas da expressão entre os dois genes *ras* nessa associação (Duplessis et al., 2005). Na associação entre *P. involutus* e *B. pendula*, o gene que codifica *ras* foi menos expresso a partir dos 25 dias de associação, na fase de funcionamento (Le Queré et al., 2005).

Em vários fungos, estudos envolvendo mutações nos genes *ras* revelaram o seu papel conservado na cascata de sinalização. No fungo *Aspergillus nidulans*, mutações no gene *ras* causaram alterações no desenvolvimento assexuado e na germinação de esporos (Som & Kolaparthi, 1994). Em *Neurospora crassa*, deleções de um gene homólogo a *ras* produziu defeitos durante o crescimento apical da hifa, na biossíntese da parede celular e na formação de conídios (Kana-uchi et al., 1997). Entre alguns fungos a proteína RAS está relacionada a virulência, como em *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Em *Candida albicans*, embora não seja essencial, a deleção de ambos os alelos produziu mutantes com a virulência atenuada, incapazes de sofrer o processo de transição da fase leveduriforme para a filamentosa (Feng et al., 1999; Leberer et al., 2001). No fungo *C. neoformans* foram avaliados os efeitos de duas proteínas *ras*. Mutantes *ras1* apresentaram defeitos no crescimento em altas temperaturas e na capacidade de *mating type*. Mutantes *ras2* não apresentaram alterações no crescimento vegetativo, na diferenciação e nos fatores de virulência. No entanto, o mutante duplo para os genes *ras* apresentou a diminuição no crescimento fúngico em todas as temperaturas analisadas (Waugh et al., 2002). No fungo fitopatogênico, *Colletotrichum trifolii* a interrupção do gene *ras* reduziu a germinação dos esporos e impediu a formação do apressório (Ha et al., 2003). No fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, patógeno humano, foram identificados dois genes que codificam RAS e relatado que os mesmos possuem papéis importantes durante a transição de micélio para levedura, resposta ao choque térmico a 42°C e na interação patógeno-hospedeiro (Fernandes et al., 2008). Assim, funções similares de RAS entre diferentes microorganismos demonstram que essas moléculas desempenham papéis centrais no crescimento e desenvolvimento de fungos (Martin et al., 2001; Fernandes et al., 2008).

Alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares têm sido demonstradas em plantas e fungos ectomicorrízicos durante a formação das ectomicorrizas (Hilbert et al., 1988). Essas alterações também envolvem genes relacionados à síntese protéica e tem sido identificado em várias associações micorrízicas, indicando que as células

vegetais necessitam organizar a estrutura e o metabolismo para formar ectomicorrizas funcionais (Duplessis et al., 2005; Morel et al., 2005; Martin et al., 2007). Vários trabalhos já foram realizados visando estudar as alterações da síntese de proteínas nos simbioses (Hilbert et al., 1988; Hilbert et al., 1991). Na fase de funcionamento da associação entre *E. globulus* e *P. microcarpus* foram detectadas alterações bioquímicas acompanhadas por acúmulo diferencial de polipeptídeos na associação. O acúmulo de 10 polipeptídios específicos da associação e outras centenas de polipeptídeos nos tecidos não colonizados foram relatados apresentando oscilações de expressão durante a formação das ectomicorrizas (Hilbert et al., 1988). Alterações na síntese protéica não ocorrem apenas no funcionamento da simbiose, mas também durante as fases iniciais do desenvolvimento (Hilbert et al., 1991). Alguns trabalhos indicam que alterações na expressão gênica relacionada à síntese protéica, iniciam-se nas primeiras fases da associação ectomicorrízica. Entre os genes relacionados com a síntese protéica, os fatores de alongação da tradução têm sido descrito como diferencialmente expressos para as interações entre *P. involutus* e *B. pendula* e *P. microcarpus* e *E. globulus* (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005). Os fatores de alongação da tradução são essenciais para a síntese protéica em eucariotos e procariotos. Na síntese protéica, após a formação do polipeptídeo nascente, é iniciado o alongamento por sucessivas ligações covalentes entre as unidades de aminoácidos, sendo que cada aminoácido é transportado ao ribossomo e corretamente posicionado pelo tRNA, que pareia com o seu códon correspondente no mRNA. À medida que cada resíduo de aminoácido é adicionado à cadeia de polipeptídeo, crescente os fatores de alongação atuam nas células hidrolizando o GTP (Riis et al., 1990). O fator de alongação EF1 $\alpha$  é uma das proteínas mais abundantes nas células eucarióticas. Os genes *ef1a* foram caracterizados para *Schizophyllum commune*, *Saccaromyces cerevisiae*, *Podospora anserina*, *Mucor racemosus* e *Phytophthora infestans* (Schirmaier & Philippsen, 1984; Linz & Sypherd, 1987; Wendland & Kothe, 1997; van't Klooster et al., 2000; Silar et al., 2001). Os genes que codificam para *ef1a* são constitutivamente expressos e estão presentes em todas as fases do desenvolvimento, como o relatado para o fungo *P. infestans* (van't Klooster et al., 2000). Para esse organismo, o gene *ef1a*, por apresentar expressão diferenciada, não foi considerado controle endógeno estável para experimentos de quantificação de transcritos pela técnica de qRT-PCR (Yan & Liou, 2006). Joneson et al., 2011, visando validar a biblioteca subtrativa supressiva

dos estágios iniciais da simbiose entre fungos e algas (líquens), também relatou variações na expressão do gene *efla* entre as replicatas avaliadas.

Os genes que codificam fatores de alongação em fungos estão presentes em múltiplas cópias em algumas leveduras do filo Ascomycota, Zygomycota e Chytridiomycota. Devido à conservação nucleotídica, esses genes tem sido utilizado em análises filogenéticas devido à baixa taxa de mutação dos nucleotídeos nas sequências (van't Klooster et al., 2000; Binder & Hibbett, 2006; Nitschke et al., 2009; O'Donnell et al., 2009).

A caracterização do gene que codifica os fatores de alongação *efla* para fungos ectomicorrízicos ainda não foi descrita. No entanto, alguns trabalhos mostram que a expressão diferencial ocorre durante a associação (Podila et al., 2002; Le Queré et al., 2005). Na associação entre *P. involutus* e *B. pendula*, os genes *efla* e *eflγ* apresentaram diminuição na expressão entre dois a oitos dias da associação ectomicorrízica. (Le Queré et al., 2005). O gene *efla* também foi detectado durante a associação *L. bicolor*-*P. resinosa*, entre seis e 72 horas, intervalo correspondendo a fase pré-simbiótica (Podila et al., 2002). Durante a associação micorrízica arbuscular entre *Glomus mossea* e *Medicago truncatula*, 11 genes relacionados vias de transdução de sinais, transcrição e tradução foram analisadas no tecido vegetal após a obtenção da biblioteca subtrativa supressiva. Entre esses genes, o fator de alongação *efl α* foi avaliado no tecido vegetal, sendo ativado a partir do 5º dia de contato com o fungo, *G. mossea* (Weidmann et al., 2004).

As análises de genes durante a formação da associação ectomicorrízica abre novas perspectivas para o entendimento da associação e a possibilidade de manipulação genética de fungos ectomicorrízicos, visando ampliar as possibilidades de aplicação dessa simbiose em benefício da sociedade.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

#### 3.1. Obtenção do fungo ectomicorrízico

Neste estudo foi utilizado o fungo ectomicorrízico *Scleroderma laeve* (VIC 31604) pertencente à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, MG. O basidiocarpo deste fungo foi coletado sob plantio comercial de *Eucalyptus grandis* no leste do estado de Minas Gerais, na cidade de Guanhães.

#### 3.2. Condições de cultivo do fungo ectomicorrízico

A cultura estoque do fungo foi cultivada em meio MNM (0,05 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,025 g de  $\text{NaCl}$ ; 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,15 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,15 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 mg de tiamina-HCl; 3 g de extrato de malte; 10 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,012 g de  $\text{FeCl}_3$ ; 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada; pH ajustado para 5,6) (Marx, 1969). As placas foram incubadas a 28 °C e as culturas mantidas pela transferência periódica para um novo meio.

Para os experimentos de micorrização *in vitro*, o meio utilizado para a germinação das sementes de *E. grandis* e o cultivo do fungo *S. laeve* foi o MNM modificado (0,05 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,0125 g de  $\text{NaCl}$ ; 0,05 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,15 g de

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,025 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 mg de tiamina-HCl; 1 g de glicose; 0,001 g de FeCl<sub>3</sub>; 10 g de ágar em 1000 mL de água destilada; pH ajustado para 5,6) (Burgess et al., 1996).

### **3.3. Estabelecimento da micorrização entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis* *in vitro***

Para estabelecer a micorrização *in vitro* entre o fungo *S. laeve* e *E. grandis* foram feitos experimentos segundo os protocolos descrito por Brun et al., (1995) e por Burgess et al., (1996) com modificações, como descrito a seguir.

#### **3.3.1. Desinfestação de sementes**

Para a desinfestação das sementes de *E. grandis*, as mesmas foram imersas por um minuto em etanol 70 %, lavadas com água destilada esterilizada, desinfestadas superficialmente com peróxido de hidrogênio 65 % por seis minutos e lavadas três vezes com água destilada esterilizada. Após a desinfestação superficial, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo 30 mL de meio MNM modificado contendo papel celofane e incubadas a 28 °C por no mínimo três dias (Burgess et al., 1996).

#### **3.3.2. Micorrização *in vitro* - Pré-simbiose**

Para a obtenção de micélio fúngico sem o contato fungo-plantas, simulando a fase pré simbiótica, os experimentos foram realizados como descrito a seguir. Após a germinação das sementes de *E. grandis*, sete plântulas foram transferidas para novas placas de Petri contendo 2/3 de meio MNM modificado. As placas foram inclinadas a um ângulo de 70 ° e transferidas para a câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e 16 h de luz com intensidade de 80 µm fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Após três dias, as raízes das plântulas foram cobertas com papel celofane e discos de ágar de 10 mm de diâmetro contendo micélio de *S. laeve*, cultivados por 20 dias em meio MNM, foram retirados das bordas e inoculados sobre o papel celofane. As placas de Petri foram mantidas por 30 dias na câmara de crescimento, após este período, o material foi

coletado e armazenado a - 80 °C. Placas de Petri contendo apenas o isolado fúngico e placas contendo apenas as plântulas foram mantidas de forma idêntica (Figura 1).

Para esse experimento foram realizados três replicatas biológicas referentes à fase pré-simbiótica, ao controle fúngico e às plântulas controle. Dessa forma, foi obtido o 1º tempo para a avaliação da expressão dos genes *ras* e *efl1a*, visando avaliar as respostas do fungo sem o contato físico com *E. grandis*.

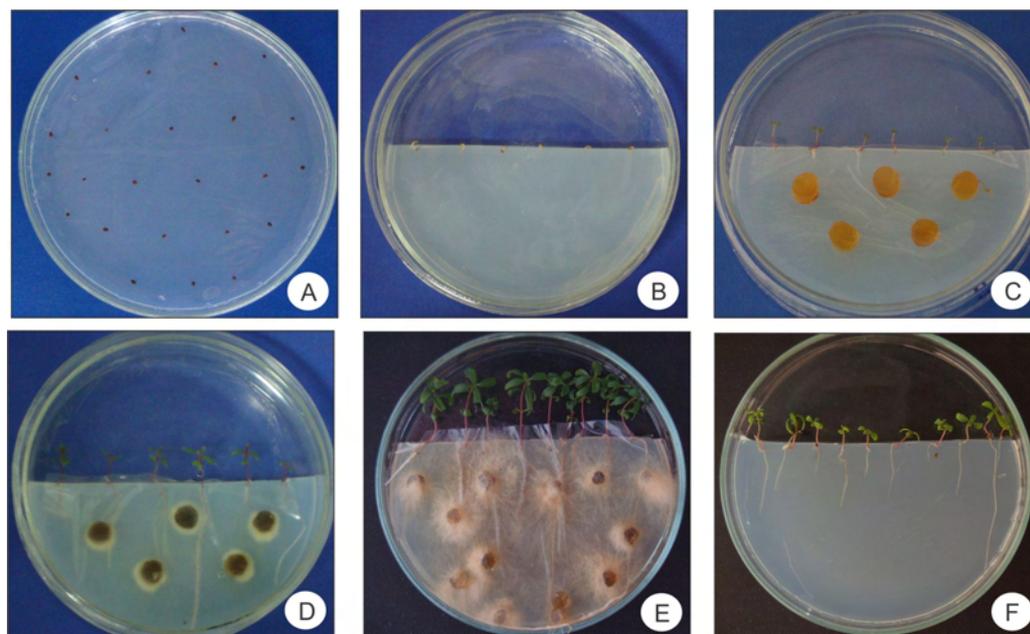


Figura 1. Sistema de micorrização *in vitro* - Pré-simbiose. Sementes de *E. grandis* inoculadas em meio de síntese após a desinfestação superficial (A), transferência das plântulas de *E. grandis* para o meio de síntese (B). Após três dias em meio de síntese, o fungo foi inoculado e seu crescimento foi acompanhado por 15 (D) e 30 dias (E). Plântulas controle foram mantidas sob as mesmas condições (F).

### 3.3.3. Micorrização *in vitro* – Simbiose

Para a obtenção de micélio fúngico durante as fases de contato fungo-planta, os experimentos foram realizados da seguinte forma. O meio de cultura, MNM modificado foi coberto com papel celofane para recobrir a superfície do meio e depois foram transferidos discos de ágar de 10 mm contendo micélio do fungo *S. laeve* sendo mantidas por 20 dias a 28 °C. Após os 20 dias de desenvolvimento do

fungo e com as plântulas germinadas assepticamente (Ver item 3.3.1), as plântulas foram transferidas para próximo dos discos de ágar contendo o micélio fúngico. As placas de Petri seladas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e 16 h de luz com intensidade de 80  $\mu\text{m}$  fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Da mesma forma, placas de Petri contendo apenas o micélio fúngico e placas contendo apenas as plântulas de *Eucalyptus* foram mantidas sob as mesmas condições (Figura 2).

Para esse experimento foram realizados três replicatas biológicas referentes a cada uma das fases (colonização, diferenciação e funcionamento), ao controle fúngico e às plântulas controle. Desta forma, foram obtidos três tempos referentes ao contato físico entre *S. laeve* e *E. grandis*, visando avaliar a expressão dos genes *ras* e *efl1a* no fungo quando em contato com *E. grandis*.

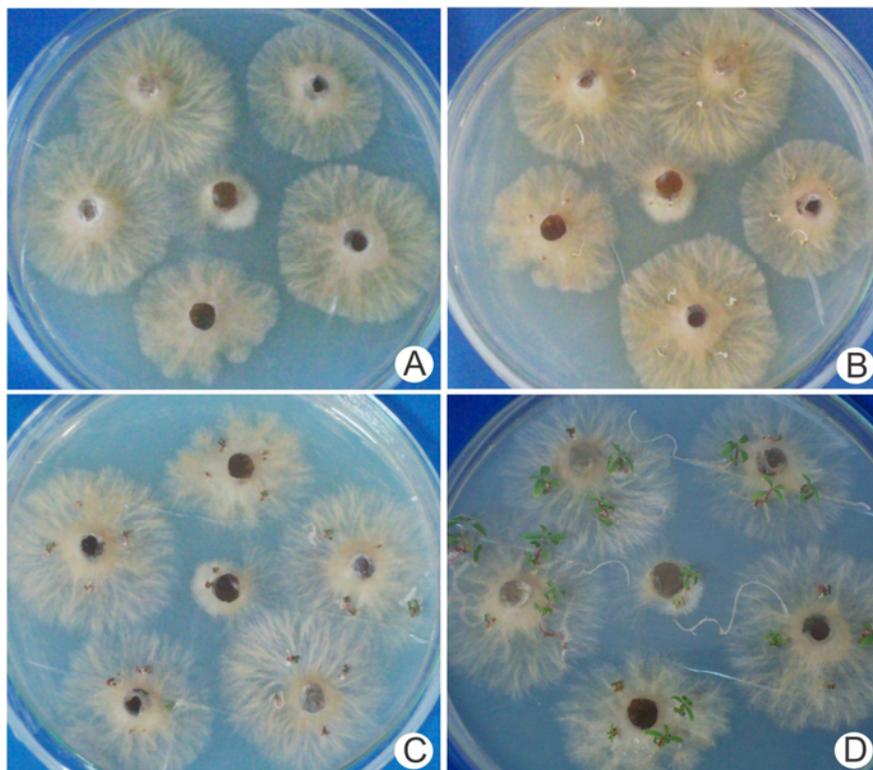


Figura 2: Sistema de micorrização *in vitro* - Simbiose. Inóculo de *Scleroderma laeve* em meio MNM modificado após 20 dias (A). As plântulas previamente germinadas foram transferidas para o inóculo de *S. laeve* e mantidas por três (B), quinze (C) e trinta dias (D).

### **3.3.4. Avaliação das ectomicorrizas de *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis***

Para análise da interação entre o fungo *S. laeve* e *E. grandis*, as raízes obtidas nos quatro diferentes tempos de interação com o fungo foram coletadas, fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%, 1:1:18, v/v) e posteriormente estocadas em álcool etílico a 70 % para os estudos anatômicos (Johansen, 1940). Duas metodologias foram utilizadas para a avaliação das raízes. Na primeira, as raízes foram imersas em tampão fosfato 0,1 M suplementado com 2,3 M de sacarose por uma hora. Após este período as raízes foram seccionadas em criomicrotomo LEICA CM 1850. Na segunda, as amostras de raízes estocadas em etanol 70 % foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais de seis µm de espessura foram obtidos em microtomo rotativo de avanço automático (Leica RM2155), com utilização de navalhas de vidro. Os cortes obtidos nas duas metodologias foram depositados em lâminas de vidro e corados com Azul de Toluidina, pH 4,0 (O'Brien T.P. and ME., 1981) para caracterização estrutural. A visualização foi realizada em microscópio Olympus IX50 e fotografadas com câmera digital Qcolor (Olympus PM-C353X).

As plântulas foram observadas durante os tempos da associação ectomicorrízica definidos neste trabalho, por meio da observação sob lupa estereoscópica (Olympus modelo SZH10) e fotografadas com câmera digital Qcolor (Olympus PM-C353X).

## **3.4. Isolamento e sequenciamento de genes em *Scleroderma laeve***

### **3.4.1. Extração de DNA total**

Para a extração de DNA total, o micélio de *S. laeve* foi cultivado em meio MNM coberto por celofane e após o crescimento por 30 dias, o micélio foi coletado com auxílio de espátulas, colocados em cadinhos e macerados utilizando nitrogênio líquido. Ao material obtido foram adicionados 8 mL do tampão de extração (Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM pH 8; NaCl 1,4 M; CTAB 2 %; β-mercaptoetanol 1%). A mistura foi mantida a 65 °C por 45 min misturados por inversão e centrifugados a 1350 g por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outros

tubos estéreis e igual volume de fenol:clorofórmio (1:1) foi adicionado ao sobrenadante, que foram misturados por inversão durante 5 min. Novamente, os tubos foram centrifugados a 1350 g por 10 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi removido para outros tubos estéreis e igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi colocado nos tubos. Após misturar por inversão durante 5 min, os tubos foram centrifugados a 1350 g por 10 minutos, a 4 °C. Esta etapa de desproteinização foi efetuada por duas vezes. O sobrenadante foi transferido para outros tubos estéreis e igual volume de isopropanol gelado foi misturado ao sobrenadante. Após 2 horas, a solução foi centrifugada a 4087 g por 30 minutos, a 4 °C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70 % gelado e ressuspendido em 150 µL de água ultrapura. A enzima RNase 100 µg/mL foi adicionada e a preparação de DNA foi incubada por 30 minutos a 37 °C, e estocada a - 20 °C.

A quantificação do DNA total foi determinada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000) a 260/280 nm e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % acrescido de brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando um sistema de fotodocumentação *Eagle-eye* (STRATAGENE®).

### **3.4.2. Amplificações das sequências que correspondem aos genes *ras*, *efl*a e rDNA 17S**

Para as amplificações das sequências gênicas parciais que correspondem aos genes *ras* e *efl* foram feitas inicialmente buscas de sequências nucleotídicas depositadas no GenBank na página do National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Essas sequências foram analisadas no programa Clustal W (Thompson et al., 2002) e alinhadas com bases nas regiões mais conservadas, e em seguida foi feito o desenho de oligonucleotídeos, utilizando o programa Primer3. As sequências dos oligonucleotídeos geradas estão disponíveis na Tabela 1. Para as reações de amplificação foram utilizados: 20 ng de DNA total, 5 µM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão 1 X Colorless GoTaq® Flexi, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U Go Taq® DNA polimerase (Promega Corporation, USA). As condições de amplificação para o gene *ras* incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguido por 35

ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 54,8 °C por 1 minuto e 72 °C de extensão por 1 min. Uma elongação final de 72 °C por 5 min foi incluída na reação. Para o gene *ef1α* incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, seguido por 39 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C de extensão por 1 min e uma elongação final de 72 °C por 5 min.

Para o isolamento do gene rDNA 17S em *S. laeve* foi utilizado oligonucleotídeos universais (White et al., 1990) para a obtenção da sequência desse gene no fungo *S. laeve*. As condições de amplificação foram as seguintes: 95 °C por dois min, seguido por 39 ciclos de desnaturação a 95 °C por um minuto, 55,0 °C por um minuto e 72 °C de extensão por um min. Uma elongação final de 72 °C por 10 min foi incluída na reação.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação das sequências parciais dos genes *ras*, *ef1α* e rDNA 17S.

Oligonucleotídeos	Sequências 5'->3'	Tamanho do fragmento
<i>rasF</i>	CAG AGC CAC TTT GTG GAT GA	367 pb
<i>rasR</i>	GCC GAC GTT TCA ATG AAT TT	
<i>ef1</i>	GGT ATC TCC AAG GAC GGT CA	879 pb
<i>ef2</i>	TGG ATG GAA CGA GTT TGA CA	
<i>NS1</i>	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	1800 pb
<i>NS8</i>	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	

O produto de PCR foi purificado utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean up system” (Promega Corporation, USA) e utilizados na reação de ligação ao vetor pGEM-T, utilizando o kit “*pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System*” (Promega Corporation, USA). Os produtos da reação de ligação foram utilizados para a transformação utilizando células ultracompetente da linhagem de *Escherichia coli* DH5α (Inoue et al., 1990; Sambrook et al., 1989). Os clones recombinantes obtidos após a transformação foram selecionados em meio Luria Bertani contendo ampicilina (50 µg/mL) e isopropil-β-D-tiogalacturonasídeo (X-Gal).

Para a confirmação da presença do inserto, foi feito o procedimento de lise rápida. As colônias foram coletadas com um palito estéril e imergidas em tubos de

microcentrifuga de 0,5 mL contendo 40 µL de solução de lise (10 mM Tris HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8; 100 mM NaOH, 1 % SDS) e mantidas por 15 min a temperatura ambiente. Foi adicionado as amostras 3 µL de HCl 1 M e 5µL de azul de bromofenol e então incubadas por 20 min em - 80 °C. Após a centrifugação a 1350 g, o sobrenadante foi aplicado em gel de agarose 0,8 % acrescido de brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando o sistema de fotodocumentação *Eagle-eye* (STRATAGENE<sup>®</sup>).

Para a extração de DNA plasmidial dos recombinantes confirmados, foram inoculados em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/mL) e foi utilizado kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, USA). O inserto dos clones foi sequenciado utilizando os oligonucleotídeos M13F (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') e M13R (5'TGTAAAACGACGGCCAGT), baseado no princípio do método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977) pela Macrogen Inc. Seoul, Korea.

### **3.4.3. Anotações das sequências obtidas**

As sequências obtidas foram primeiramente analisadas por meio do programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>), para a retirada de sequências do vetor. Essas sequências foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando o algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1997). Foram consideradas apenas as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas obtidas e de aminoácidos do banco de dados contendo o valor  $e > 10^{-4}$ .

Para análises dos possíveis exóons dentro das sequências obtidas e possíveis localizações de íntrons, foi utilizado o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), que identifica todos os quadros de leitura de uma sequência mínima, utilizando os códigos padrões ou alternativos. A sequência de aminoácidos pôde ser salva e analisada nos bancos de dados utilizando o algoritmo BLASTP. A sequência de aminoácidos obtida também foi analisada pelo banco de dados de Domínios Conservados do NCBI (Marchler-Bauer et al., 2010).

### 3.5. Análise da expressão dos genes *ras* e *ef1a* por RT-PCR em ectomicorrizas de *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*

#### 3.5.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, as amostras referentes a cada um dos tempos obtidos pré-simbiose, três, 15 e 30 dias após a simbiose, por meio da micorrização *in vitro* foram coletadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA total. A metodologia utilizada foi realizada conforme Chang et al., 1993, com modificações, como descrito a seguir.

As amostras dos quatro tratamentos foram maceradas utilizando nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino. Cerca de 300 mg desse pó foram transferidos para tubos de polipropileno 1,5 mL contendo 750  $\mu\text{L}$  do tampão de extração (Tris HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, NaCl 2 M, CTAB 2 %, PVP 2 %, espermidina 0,5 g/L e  $\beta$ -mercaptoetanol 2 %) pré aquecido a  $65^{\circ}\text{C}$ . Os tubos foram agitados gentilmente e incubados imediatamente em banho maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) por extrato, homogeneizados gentilmente e centrifugados a 10621 g por sete minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo. Novamente, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) por amostra, homogeneizados gentilmente e centrifugados a 10621 g por sete minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo, onde um volume equivalente de LiCl/EDTA (7,5 M LiCl, 50 mM EDTA) foi adicionado, homogeneizado delicadamente por inversão e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  por pelo menos uma hora. Após a centrifugação a 10621 g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80 %. Após uma centrifugação de 10621 g por sete minutos, o sobrenadante foi removido por decantação. O sedimento foi ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  de água – DEPC (Dietil pirocarbonato).

O RNA total extraído foi avaliado quanto a sua pureza e quantificação determinada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000) a 260/280 nm e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % acrescido de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O gel foi analisado sob luz ultravioleta e sua imagem foi digitalizada utilizando um sistema de fotodocumentação *Eagle-eye*

(STRATAGENE®). Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase RQI RNase-free (Promega Corporation, USA).

### 3.5.2. Análise da expressão por RT-PCR

Inicialmente, as reações de síntese da primeira fita de cDNA foram realizadas a partir do mRNA obtidos nos quatro tratamentos utilizando o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega Corporation, USA), segundo as instruções do fabricante. As reações de síntese da segunda fita de cDNA foram realizadas utilizando oligonucleotídeos previamente desenhados para os genes *ras* e do fator de alongação *ef1a* e para o gene rRNA 17S (Tabela 2) baseado nas sequências de *S. laeve* obtidas.

Tabela 2: Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR

Oligonucleotídeos	Sequências 5' -> 3'	Tamanho do fragmento
<i>rasf1</i>	CGA GGG CTT CCT TCT CGT AT	150 pb
<i>rasr2</i>	GCC GAC GTT TCA ATG AAT TT	
<i>ef1</i>	GGT ATC TCC AAG GAC GGT CA	749 pb
<i>ef2</i>	TGG ATG GAA CGA GTT TGA CA	
<i>17SF</i>	GTA AAA GTC CTG GTT CCC	550 pb
<i>17SR</i>	GGA AGG GAT GTA TTT ATT AG	

Para a reações de amplificação de cada gene foram utilizados: 20 ng de cDNA, 5 µM de cada oligonucleotídeos iniciador, 200 µM de cada desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão 1 X Colorless GoTaq® Flexi, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U Go Taq® DNA polimerase (Promega Corporation, USA). As condições de amplificação para o gene *ras* incluem um passo de desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto e 72 °C de extensão por um min. Uma alongação final de 72 °C por 10 minuto foi incluída na reação. Para o gene *ef1*, uma desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, seguidos por 39 ciclos de desnaturação a 95 °C por um minuto, 62 °C por um minuto e 72 °C de extensão por um minuto. Uma alongação final de 72 °C por 10 minuto foi incluída na reação.

A reação referente ao rDNA 17S possui as seguintes condições de amplificação: 95 °C por dois minutos, seguido por 39 ciclos de desnaturação a 95 °C por um minuto, 55,0 °C por um minuto e 72 °C de extensão por um minuto. Uma elongação final de 72 °C por 10 minutos foi incluída na reação.

O produto de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1 %, acrescido de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e as imagens foram digitalizadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estabelecimento da interação entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis* e avaliação morfológica das raízes durante as fases de formação das ectomicorrizas

A técnica de micorrização *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis* foi analisada pela primeira vez sendo as quatro fases da formação das ectomicorrizas observadas durante a associação.

Na fase pré-simbiótica, onde não houve contato físico entre fungo e planta, mudanças morfológicas ocorreram nas raízes. Essas mudanças mimetizaram alguns dos efeitos da associação como, aumento no número de raízes laterais e a diminuição do desenvolvimento dos pêlos radiculares, que ocorrem quando ambos os simbiontes estão fisicamente unidos. A fase pré-simbiótica foi avaliada durante o período de 30 dias (Figura 3).

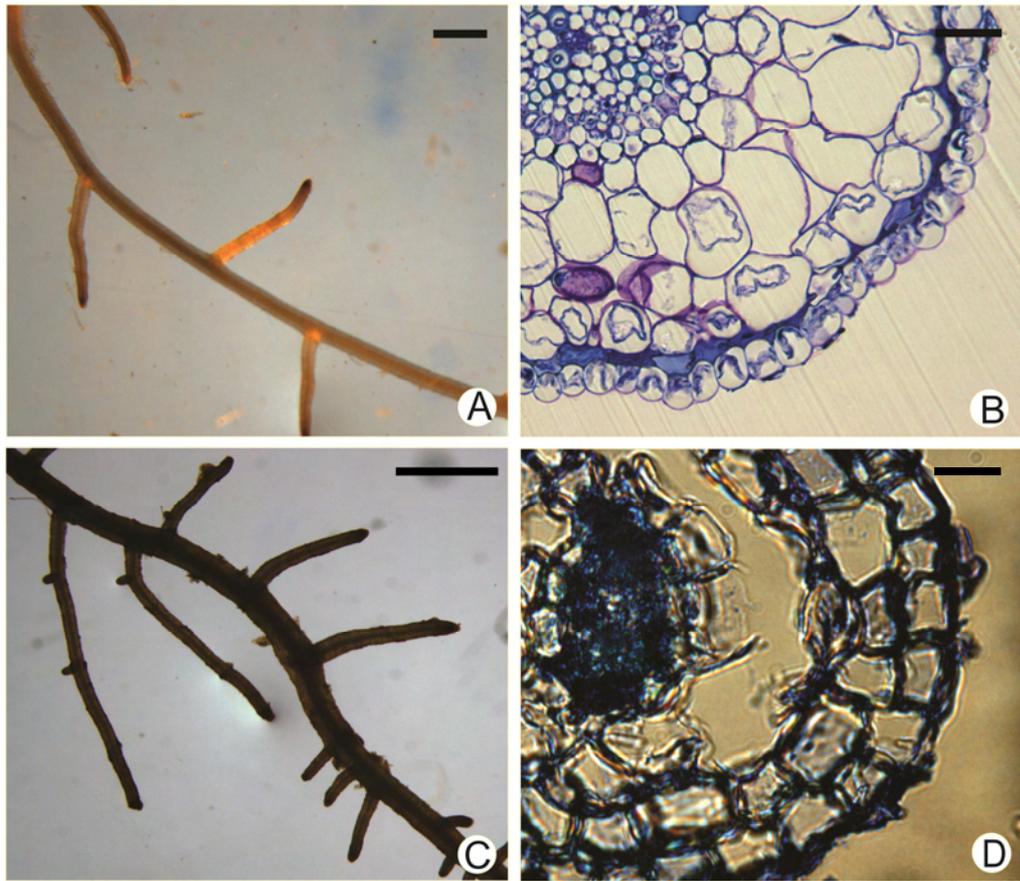


Figura 3: Alterações morfológicas durante a fase pré-simbiótica da micorrização *in vitro* entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*. Raiz de *Eucalyptus grandis* após 30 dias sem a presença do fungo *Scleroderma laeve* (controle) (A), e corte anatômico transversal da raiz de *Eucalyptus grandis* sem a presença do fungo *Scleroderma laeve* (B). Raiz de *Eucalyptus grandis* após 30 dias de crescimento na presença do fungo *Scleroderma laeve* (C) e corte anatômico transversal da raiz de *Eucalyptus grandis* após 30 dias de crescimento simulando a fase pré-simbiótica. Barras: A e C = 5 mm. B e D = 500  $\mu$ m.

Em três dias de contato físico entre fungo e planta, as alterações morfológicas observadas foram as mesmas quando comparadas com a fase pré-simbiótica. Dentre as alterações foram observadas a diminuição da formação dos pêlos radiculares, o início da formação das raízes laterais e do manto fúngico (Figura 4).

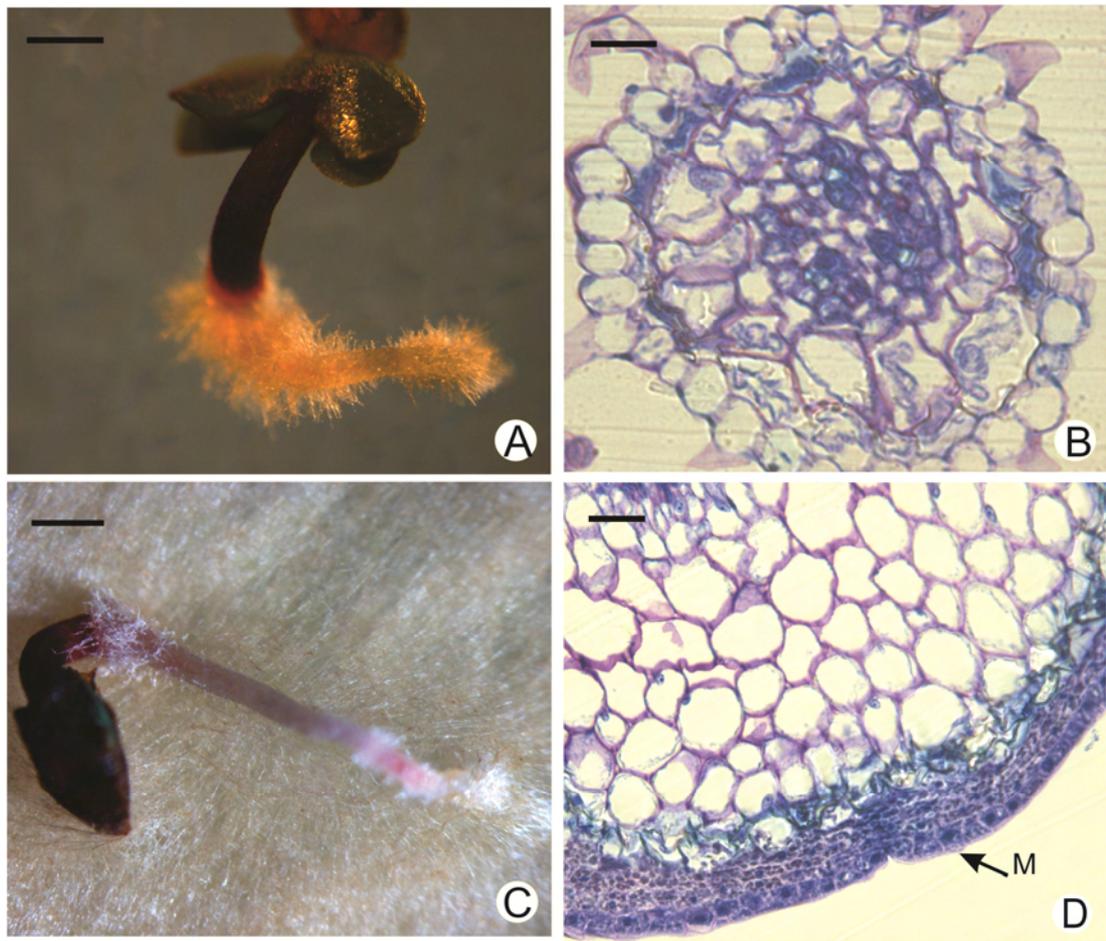


Figura 4: Alterações morfológicas após três dias da micorrização *in vitro* entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*. Plântulas de *Eucalyptus grandis* após três dias sem o contato físico com *Scleroderma laeve*, controle (A) e após três dias de contato, tratamento (C). Cortes anatômicos transversais das raízes controle (B) e em tratamento (D). A seta indica o manto fúngico (M) formado nas plântulas de *Eucalyptus grandis* após três dias de contato. Barras: A e C = 5 mm, B e D = 10  $\mu$ m.

Os dias seguintes de interação entre o fungo e a planta, foram observados uma progressão de eventos que culminaram na formação das ectomicorrizas. A parte aérea das plântulas de *E. grandis*, o alongamento anticlinal das células da epiderme da raiz, a ramificação da raiz principal e a formação do manto fúngico, se desenvolveram ainda mais quando comparados aos três dias contato. No entanto, os pêlos radiculares diminuíram gradativamente ao longo dos 30 dias.

A formação da rede de Hartig iniciou-se antes do 15<sup>o</sup> dia de contato, uma vez

que esta já estava presente, quando os cortes histológicos foram realizados. (Figura 5). A rede de Hartig, uma vez formada, manteve-se até o 30° dia (Figura 6).

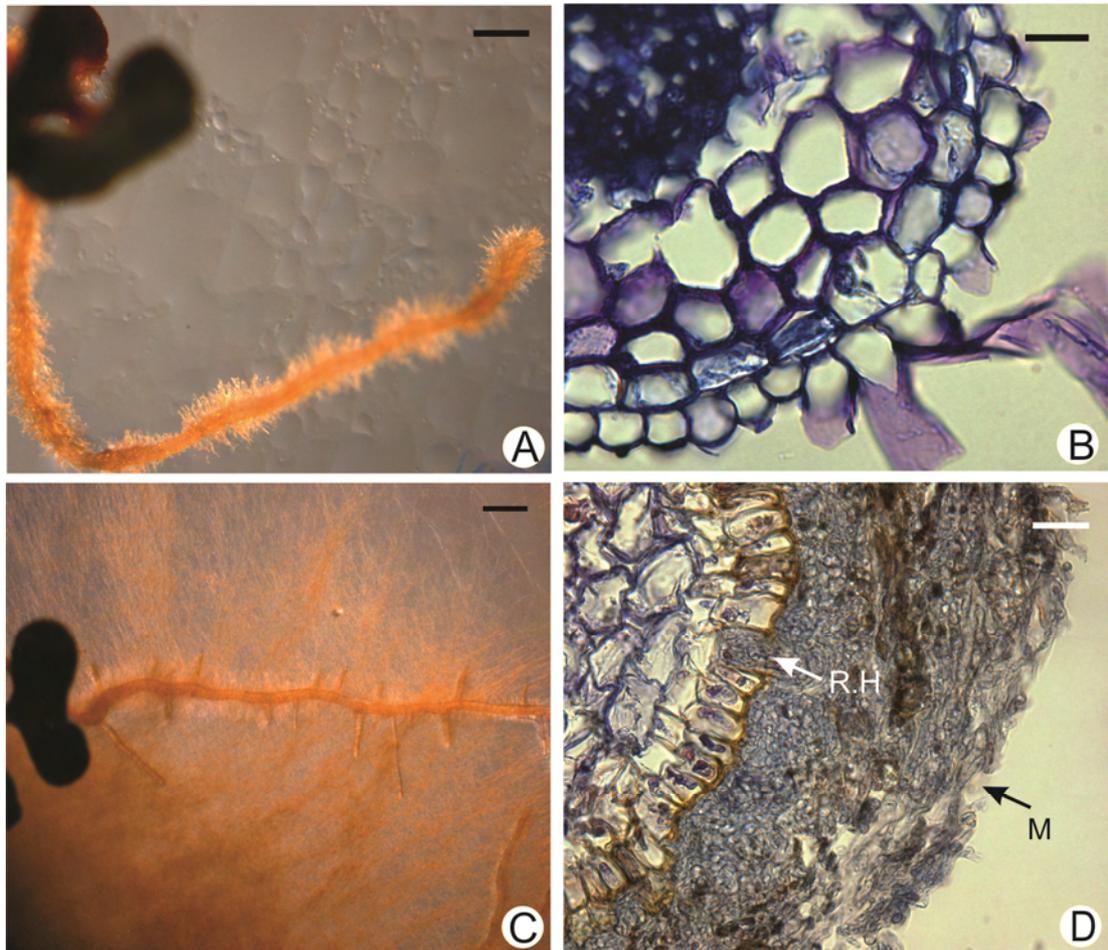


Figura 5: Alterações morfológicas após quinze dias da micorrização *in vitro* entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*. Plântulas de *Eucalyptus grandis* após quinze dias sem contato com *Scleroderma laeve*, controle (A) e após quinze dias de contato, tratamento (C). Cortes anatômicos transversais das raízes controle (B) e em tratamento (D). As setas indicam o manto fúngico (M) e a rede de Hartig (RH) formada nas plântulas de *Eucalyptus grandis* após quinze dias de contato. Barras: A e C = 5 mm, B e D = 10  $\mu$ m.

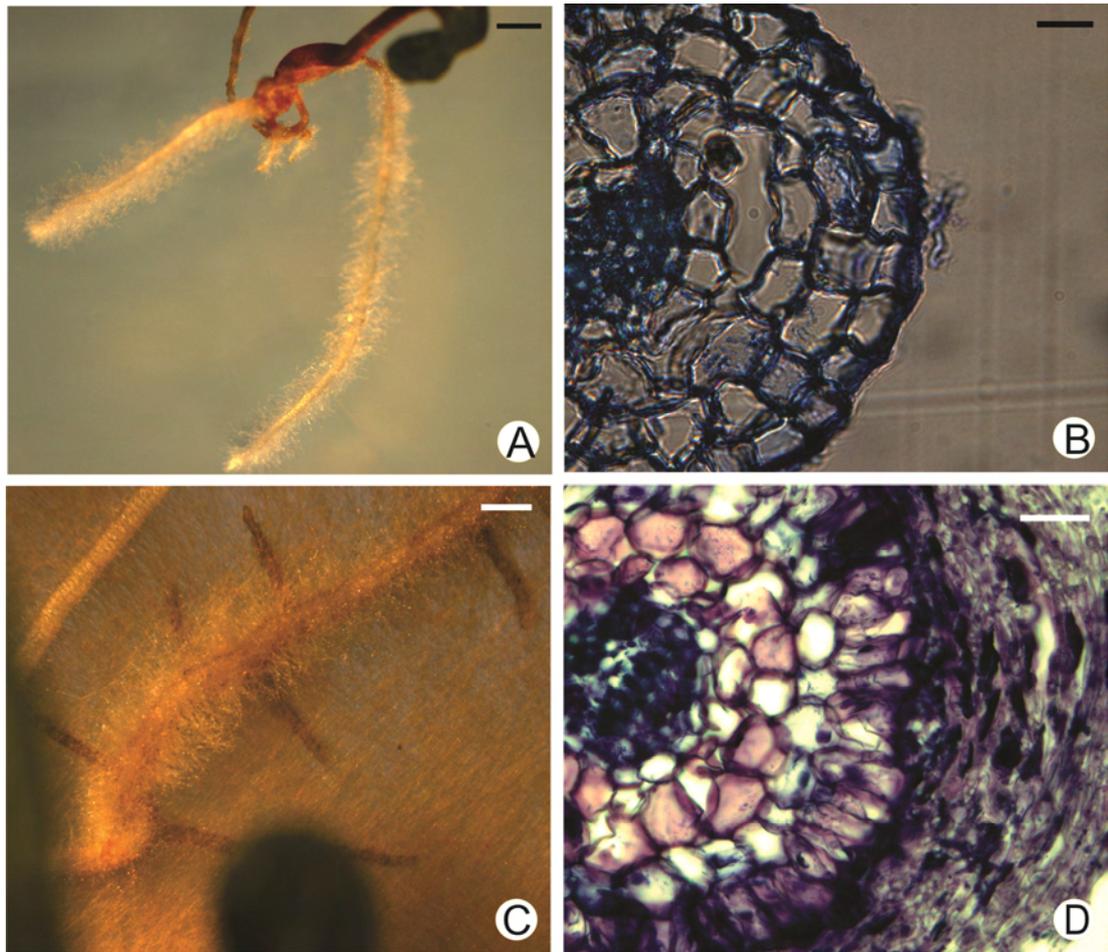


Figura 6: Alterações morfológicas após trinta dias da micorrização *in vitro* entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*. Plântulas de *Eucalyptus grandis* após trinta dias sem contato com *Scleroderma laeve*, controle (A) e após trinta dias de contato, tratamento (C). Cortes anatômicos transversais das raízes controle (B) e em tratamento (D). Barras: A e C =5 mm, B e D = 10  $\mu$ m.

As alterações morfológicas observadas nas plântulas quando estas se encontravam nas diferentes fases da formação da ectomicorriza, não foram observadas nas plântulas que não estavam em contato com o fungo, evidenciando e garantindo o sucesso da técnica de micorrização *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*.

#### 4.2. Isolamento das sequências parciais dos genes, *ras*, *efl $\alpha$* e rDNA 17S de *Scleroderma laeve*

A partir do estabelecimento da técnica de micorrização *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*, a expressão de genes durante as diferentes fases da formação das ectomicorrizas pôde ser avaliada. Entre os genes avaliados, os envolvidos nas vias de transdução de sinais e síntese protéica têm sido detectados em várias associações ectomicorrízicas e não existem trabalhos relacionados a esses genes com o fungo *S. laeve*.

A partir do alinhamento de sequências disponíveis no NCBI referente aos genes *ras* e *efl $\alpha$*  em outros organismos e a síntese de oligonucleotídeos, neste trabalho foram isoladas sequências parciais dos genes *ras* e *efl $\alpha$* . A reação em cadeia de polimerase para a amplificação dos genes resultou em fragmentos de DNA de 367 pb e 879 pb, correspondendo aos tamanhos esperados (Figura 7 A-B). Esses fragmentos de DNA foram purificados, clonados e sequenciados para a confirmação desses genes.

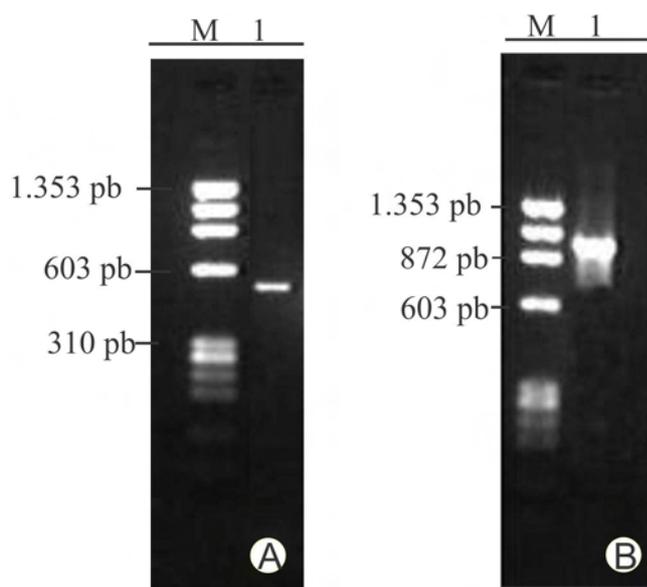


Figura 7: Detecção dos genes *ras* (A) e *efl* (B) em *Scleroderma laeve*. Eletroforese em gel de agarose 1,2 % dos produtos de amplificação do gene *ras*, *efl $\alpha$*  de *Scleroderma laeve*. M: Marcador  $\Phi$ X 174/*Hae III*, 1: *Scleroderma laeve*.

A sequência referente ao gene *ras* em *S. laeve* foi avaliada e comparada com as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI, utilizando o algoritmo BLASTX. A sequência analisada neste trabalho apresentou similaridade entre 68 a 91 % com genes que codificam a proteína RAS em vários organismos. Os genes com maior similaridade são fungos pertencentes ao filo Basidiomycota. Entre eles, *Ustilago maydis*, *Pseudozyma flocculosa*, *Trametes hirsuta*, *Pisolithus* sp., *Suillus bovinus* entre outros. A Tabela 3 apresenta alguns dos organismos com proteínas RAS similares a proteína putativa codificada pela sequência do gene *ras* de *S. laeve*.

Tabela 3: Identificação da possível proteína codificada pela sequência do gene *ras* obtida no fungo *Scleroderma laeve*.

Organismo	Nº acesso GenBank	Similaridade (%)	Valor <i>e</i>
<i>Ustilago maydis</i>	XM_752040.1	88 %	8 e <sup>-33</sup>
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	ADB 55717.1	88 %	7 e <sup>-32</sup>
<i>Trametes hirsuta</i>	BAD91453.1	90 %	1 e <sup>-29</sup>
<i>Pisolithus</i> sp.	AF329890.1	90 %	2 e <sup>-29</sup>
<i>Suillus bovinus</i>	AF250024.1	90 %	9 e <sup>-29</sup>
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001836360.2	90 %	1 e <sup>-28</sup>
<i>Puccinia graminis</i>	XP_003331739.1	83 %	5 e <sup>-27</sup>
<i>Cryptococcus gattii</i>	XP_003192157.1	91 %	6 e <sup>-25</sup>

A sequência parcial do gene *ras* foi alinhada com as sequências correspondentes ao gene *ras* em alguns fungos basidiomicetos, que estão disponíveis no NCBI. O alinhamento foi realizado para localizar as posições dos oligonucleotídeos iniciadores e analisar a conservação nucleotídica da sequência obtida neste trabalho. Os oligonucleotídeos estão localizados nas posições 112 e 435 do alinhamento obtido e as sequências apresentaram conservação de aproximadamente 40 %, calculadas pelo programa Mega 5 (Figura 8).

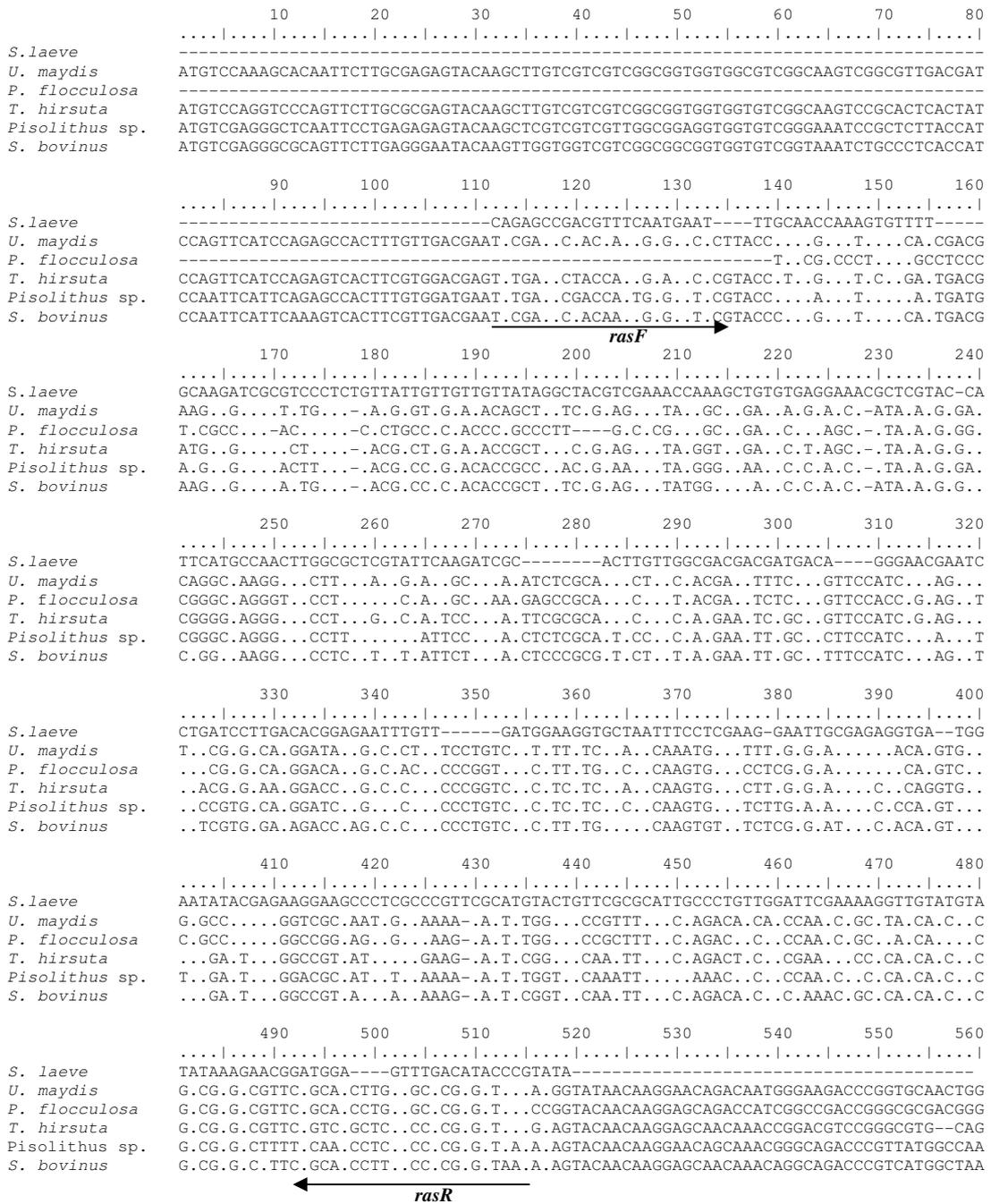


Figura 8: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene *ras* em fungos. As seqüências alinhadas pertencem a *Scleroderma laeve*, *Ustilago maydis* (XM\_752040.1), *Pseudozyma flocculosa* (GQ922825.1), *Trametes hirsuta* (AB175073.1), *Pisolithus* sp. (AF329890.1) e *Suillus bovinus* (AF250024.1). As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados e as direções das amplificações estão indicadas. As linhas pontilhadas indicam as bases conservadas entre as seqüências (Clustal W).



A sequência parcial do gene que codifica o fator de alongação *ef1α* também foi obtida neste trabalho. A sequência parcial do gene *ef1α* foi alinhada com as sequências que correspondem ao gene *ef1α* em alguns fungos, que estão disponíveis no NCBI utilizando o algoritmo BLASTX. A sequência analisada apresentou similaridade entre 83 a 94 % com sequências que codificam a proteína EF1α em vários organismos. Os organismos com maiores identidades foram *Gloeophyllum mexicanum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Pycnoporus* sp. e *Stereum hirsutum* entre 90 e 93 %. A Tabela 4 apresenta alguns dos organismos com proteínas EF1α similares a proteína putativa codificada pela sequência do gene *ef1α* de *S. laeve*.

Tabela 4: Identificação da possível proteína codificada pela sequência do gene *ef1α* obtida no fungo *Scleroderma laeve*.

Organismo	Nº acesso GenBank	Similaridade (%)	Valor e
<i>Gloeophyllum mexicanum</i>	ADV17852. 1	92	1 e <sup>-125</sup>
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	ADV17856. 1	91	3 e <sup>-125</sup>
<i>Pycnoporus</i> sp.	AAAY46266. 1	90	3 e <sup>-125</sup>
<i>Stereum hirsutum</i>	AAW81768. 1	93	7 e <sup>-125</sup>
<i>Heliocybe sulcata</i>	ADV17857. 1	91	1 e <sup>-124</sup>
<i>Neolentinus lepideus</i>	ADV17861. 1	91	1 e <sup>-124</sup>
<i>Gymnopus contrarius</i>	ADK11805. 1	91	2 e <sup>-124</sup>
<i>Neolentinus adhaerens</i>	ADV17858. 1	92	3 e <sup>-124</sup>

A sequência parcial do gene *ef1α* foi alinhada com as sequências que corresponde ao gene *ef1α* em alguns fungos que estão disponíveis no NCBI. O alinhamento foi realizado para localizar as posições dos oligonucleotídeos iniciadores e analisar a conservação nucleotídica da sequência obtida este trabalho. Os oligonucleotídeos estão localizados nas posições 344 e 1260 do alinhamento obtido e as sequências apresentaram conservação de aproximadamente 32 %, calculadas pelo programa Mega 5 (Figura 10).

330 340 350 360 370 380 390 400  
S.laeve .....TTGGATGGAAACGAGTTTGACAATGC-AAGCATCACCAGACTGACGAATTTAGGCGGAT  
S.polyrhizum TTGGTGTCCGTCAGCTCATTG.Y.CCGTC...A.A.G...CCA.C...GT.AGTTTTT-CTG.CTTA-.AA.TTGT  
P.tinctorius TCGGTGTCCGTCAGCTCATTG...CCGTC...A.A.G...T.C.A.C...GT...GTTTTG.CCCT---CGATT.C...  
A.hygrometricus TTGGCCTTCGTCAGCTCATTG.C.CCGTC...A.A.G...CCA.C...GT...GTTAT.G.TGTC.T.-.C.TTTTA  
G.lividus TCGGTGTCCGTCAGCTCATTG...CTGTT...A.A.G...C.A.C...GT.TTTTTTTT.C.CGC.T.G.CAGG..TG  
B.merulioides TCGGTGTCCGTCATTATATG...CCGTC...A.A.G...C.A.C...GT.T...ATTT...T.C---.GCAA.GT.

**eIF**

410 420 430 440 450 460 470 480  
S.laeve GT-TCAGAGACTTGCCACTC---CGAGCATCAATCTTCGATCAGTTCAGCAAACTTGC---AAGCAATGTGGCCGT-  
S.polyrhizum .AA.TTT.GCG..CA.--AG.ATTC..AG.GG.G.GAG---.GT...ATG..A.C.TTA.G.AG.CC.CCA..T.C  
P.tinctorius C.G.TCGAGCGT..A.G.GATA-T.ATTAG.GG.G.GAG---.C.GT...ATG..A.C.TCA.G.A..CT.C.A.TT.C  
A.hygrometricus CG-.TT..G.G..CA...AA.ACC.A.TAG.GG.G.GAG---.C.GA...ATG..A...TCA.G.A..CY.CCA..T.T  
G.lividus TGGA.TT.G-.T.AATTGG.T-A.A..AG.GG.G.GAG---.C.GC...A.G..A.CATCA.G.A..CT.CCA..T.C  
B.merulioides T.GCTTGC.C-TAG..GCAAT--T.T..AG.GG.GTGAG---.C.GT...A.G..A.ATCA..A.CC.CCA..T.C

490 500 510 520 530 540 550 560  
S.laeve ---ATGGCAATCAAGTACGGGTGCATAACCGGCACCAATCTGACCGGGATGGTTGAGGACGATGACCTGAGCAGTGAAGG  
S.polyrhizum ATT.A.AAGG..GGT...A.ACCC..AGG.A.T.G.ATT.G.CC..ATCTCT.GCTG.C...G...A...TT..  
P.tinctorius ATT.A.AA.G.TGGC...A.ACCC..A.G...TTG.ATTCC.CC.TATTTCT.GCTG.C...G...A...TT..  
A.hygrometricus ATC.A.AAGG..GGT...A.ACCC..AGG.T.T.G.ATTCC.CC..ATCTCT.GGTG.C...G...A...TT..  
G.lividus ATT.A.AAGG..GGT...A.ACCC..AGG.T.TTG..TTCC.CC.AATCTCT.GCTG.C...G...A...TT..  
B.merulioides ATT.A.AAGG..GGT...A.ACCC..AGG.T.TG..TTCC.CC..ATCTCT.GCTG.C...G...A...TT..

570 580 590 600 610 620 630 640  
S.laeve ACGCAGCCTCTTTAGCAGGGTCAATC---TTAGAGTCGGATGCAACATTTCCACGACGAATATCCTTGAAGCAGCTTC  
S.polyrhizum .G...T.CTC.A..TGA.CGTC.C.TAT...TTTATCTTACTTGA..ACTTGAAT.TG.CT.GGA.C.A.AG..T.CCA  
P.tinctorius .A..CT.CACCA..T---TGAT.A---.CTCT.TT.T...ACCG-ATT-CT...CCGT.GA..AG..T.CCA  
A.hygrometricus .A..T..GCCA..T.T.CGTCAAT---C...TCTCT.TTACGT---.A.TT.ACT-----G.CA.A.AG..T.ACA  
G.lividus .G...T.C.CCA..T.A.TGTA.A---.AG-GCC.AATCCA..T.CACGTTTCT---.GAG.CC.ACAG..T.CC  
B.merulioides .G...T.C.CCA..T.A.TAACGAA---.CGC.TGGAAT.AAGG.CCA-G.GACT---.AAT..A..AG..T.CCA

650 660 670 680 690 700 710 720  
S.laeve CTATGCAGATGTTAGAT---GATATTCTCGCTG---GCCAACTAAAACACTGACTTACGCTGAAACCCGACGTTG-  
S.polyrhizum TGG.T..AGG..G.G..CAAGG..A..CAAG.G..GTGTC...GGG...GAC.C.T...C.ATTGAT.C.A..A  
P.tinctorius TGG.A..A.G..G..CCAAG..A.CCAAA.G..GTGTC.T...GGGC..GAC.C.T...T.CCATGA..C.A.C.A  
A.hygrometricus TGG.A..AGG.C.G..CTAAG..A..CAAG.GC.GTACT.T...GGGC..GACGC.C...T.CCATGA..CAA..A  
G.lividus TGG.AT.AGG.C.G..CCAAG..G.CCAAG.G..GTGTA.TG..GGGC..GACTC.C...T.CCATGA..C.A.C.A  
B.merulioides TGG.A..AGG.C.G..CCAAG..G.CCAAG.G..GTGTC.T...GGGT..GAC.C.C.C...C.ATCGA..C.A.C.A

730 740 750 760 770 780 790 800  
S.laeve -TCACAGGGACACCCCTCT-ACAAGCTGCTCGTGGTGCATTTCAACGGACTTGAAGTTCGGTAGCAGTGGTGGGGGGG  
S.polyrhizum GC.T..C.TCCGT..T..G...CT...CGAC.T.C.C.TC.G.A---.T.A.AAG.TCGGT.G.ATC..AACA  
P.tinctorius GC.C..C.TCCGT..T..G...CT...CG.C.T.C.C..C.G.A---.T.A.AAG.T.GGT.G.ATC..CACA  
A.hygrometricus GC.T...TCCGT...CG...CC...CGAC.T.C.C.TC.G.A---.T.A.AAG.TCGGT.G.ATC..AACA  
G.lividus GC.C...TCCGT...CG...CC...CGAC.T.CCC..C.G.A---.T.A.AAG.TCGGT.G.ATC..AACA  
B.merulioides GC.T..T.TCCGT..T..CG...CT...CGTC.T.CCC.TC.G.A---.TG.A.AAG.TCGGT.G.ATC..AACT.

810 820 830 840 850 860 870 880  
S.laeve AAGGTGACGACCATGCCAGCCTTGATGACACAGCTCTCGACAGGGCAACAGGTAC---TGTTCCAAATCACCAGGATT  
S.polyrhizum T.C.C..T..GT.G..T.GAGAC..G..T..TT.AGGCT.G..T..T.GT..CC.T.GCTCCGA..CGTA..TAC.GAA  
P.tinctorius T.CCA.TA.G..G..T.GAGAC..G..T..T..AGGCT.G..T..T.GT..C..TTGCACC...G..CGTT...AC.GAA  
A.hygrometricus T.CCA.T..GT.G..TTGAGAC..G..T..T..AGGCT.G..T..T.GT..CT.T.GCTCC.A.A..CGTG..AC.GAA  
G.lividus T.CCC.T..GT.G..TTGAGAC..G..T..T..AGGCT.G..T..T.GTT.CC.T.GCTCC.A.G..GTG..TAC.GAA  
B.merulioides T.CCG.T..GT.G..TTGAGAC..G..AT..T..AGGCT.GA.T.AT.GTT.AC.T.GCTCC..G..CGTG..AC.GAA

890 900 910 920 930 940 950 960  
S.laeve GTAGACATCCTGGAGAGGAAGTCCGAGAGGCTTGTGCGAGGGACAGTGGGAGGCTCGATGGCATCGATGGCATCAAGAA  
S.polyrhizum .CA.GTC.G.T..A.T.C.CCAC..ACA...A.AG..TGTCCC...TGACAA..TC..TT..A---.G...T.  
P.tinctorius .CA.GTC.G.C..A.T.C.CCAC...CA...T.AG..TGTCCC...TGATAA..TC..TT..A---.G...T.  
A.hygrometricus .CA.GTC.G.T..A.T.C.CCAC...CAA...AACAG..TGTCCC...TGACAA..TC..TT..A---.G...T.  
G.lividus .CA.GTC.G...A.T.C.CCAC...CA..C..T.A...TCTTCCC...TGACAA..TC..TT..A---.G...T.  
B.merulioides .CA.GTC.G.C..A.T.C.CCAC...CAA...T.AG..TGTCCC...AGACAA..TC..TT..A---.G...TG

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
S.laeve GG--GTCTCCCTTTGACTACACAGCCTTGGTTCTTTGGTCCAACCCCTGAACCATGGCATGCTATTGATTGGTCA-G  
S.polyrhizum T.TAT.T..TTGG.C.GTA.GGGT.ATA.CA.C.AACA--C.TGT.TTAG...GTGTC.G.CAAGGAT...C...GT.  
P.tinctorius T.--TAA..T.GACA.T.GAGGG.ATTACTTG..GACC--.ACT.ATAG...GTCTCTG.CAAGGAT...C...GT.  
A.hygrometricus C.--T.TCC.TGA.C.G...A.GAG.ATA.C.A.C.AACA--.ATGTA..AG...GTCTC.G..AAGGAT...C.C.GT.  
G.lividus C.--TGG..TATC.CCG.C..CTT.TT..CACCG.ACCGATCTTCTGTG.AG...GTCTCGG.CAAGGAT...C...GT.  
B.merulioides C.--CAG..TT.A.-.GAC.T.ATTTT..CTTCC.GACA--.TC-.G.AG...GT.TCGG.CAAGGAT...C...GT.

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
S.laeve ACCCAATCGCTTATG--TAAGAAATAGGAGACGCTTACTTGGTAGACTCCTCCAACATGTTG-TCGCCGTGC-CAGCCAG  
S.polyrhizum G.AACG...C.CC.AC.CCA.G.AC.ACCCT...A.GGA..CT.C...T.T...TGCTCA.G.TATT...T.A...C  
P.tinctorius GTAACG...C.CC.AC.CCA.G.AC.ACCCT...CA.GGA..CTTCA..T.T..CTGCTCA.G..ATT..C.T.A...C  
A.hygrometricus GGAATG.T.C.C..AC.CCA.G.AT.ACCCT...CA.GGA..CC.CG..T.T..CTGCCCCA.G.TAT...C.TT.A...C  
G.lividus G.AATG...C..AC.CCA.G.AC.ACCCT...A.GGA..CC.CT..T.T...GCTCA.G..AT...C.T.A...C  
B.merulioides GAAACG...CC.AC.CCA.G.AT.ACCCA..CA.AGA..CT.CG..T.T...GCTCA.G..AT...C.T.A...C

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
S.laeve A--GATGGGACGAATGCGACTGCTTTGGGGTTGTAACCAACCTTCTTAATAAAGGTGGATGTTCTTGCACAATTTCTG  
S.polyrhizum CCC.G.CAAATT.GTGC..GT.ATGCACCT..GC.CGATTG..ACACGGCCC.CAT..CC..CAAGT...CTG.GC..A.  
P.tinctorius CCT.GCCA.AT..GTGCT.G..A.GC.CCT..GC.TGATTG..ACACGGCCC.CATC..CAAGT...C.G.GC..A.  
A.hygrometricus CCC.G.CA.ATT.GTGC.T.G.A.GC.CCC..GC.TGA.TG..ACACGGCCC.TAT..CT..CAAGT...CTG.GC..A.  
G.lividus CCT.G.CA.ATT.GTGC.T.G.A.GC.CCA...C.TGATTG..ACAC.GCCC.CATC..CC..CAAGT.C.CTG.GC..A.  
B.merulioides

Continua na próxima página



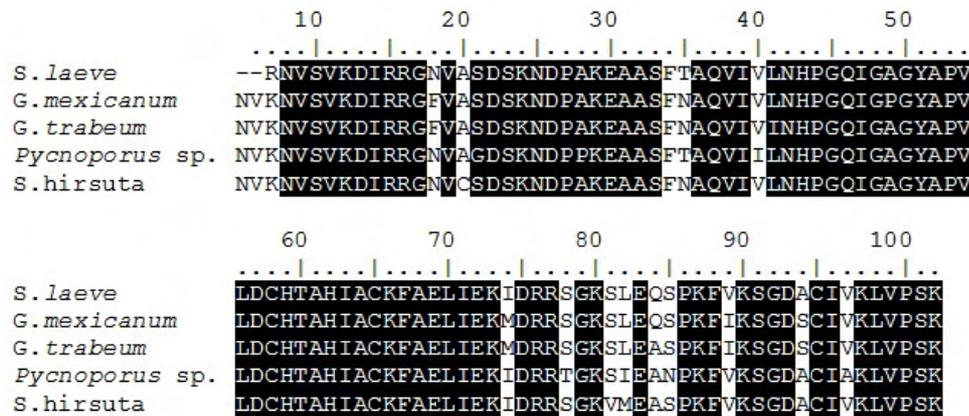
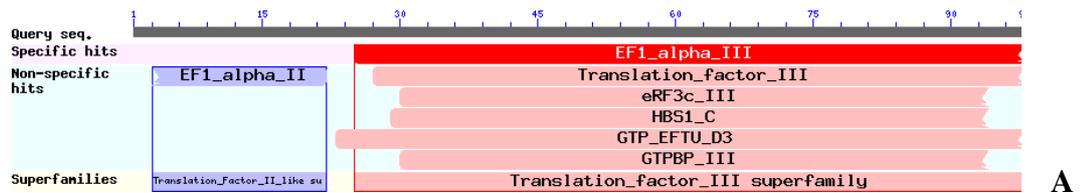


Figura 11: Determinação da família do gene *ef1a* e alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína EF1 $\alpha$  em fungos. (A) Confirmação da superfamília dos fatores de tradução. (B) As sequências utilizadas para o alinhamento pelo ClustalW pertencem a *Scleroderma laeve*, *Gloeophyllum mexicanum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Pycnoporus* sp., *Stereum hirsutum*. As sequências idênticas estão em destaque.

A sequência correspondente a região rDNA 17S de *S. laeve* foi amplificada, clonada e sequenciada, com objetivo de avaliar a homogeneidade das amostras de RNA totais obtidas, uma vez que a expressão deste gene não altera durante os tempos avaliados. A sequência parcial do gene rDNA 17S, correspondente a 877 pb, foi obtida e comparada com as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI, utilizando o algoritmo BlastN. A identidade variou de 99 a 96 % entre membros do filo Basidiomycota. A sequência mais próxima corresponde a sequência de *S. laeve* (DQ 534694.1) com 99 % de identidade ao isolado *Scleroderma citrinum* (AF 026621.1) com 98 % e ao isolado *Pisolithus arrhizus* (DQ 534688.1) com 97 %. Esta sequência também pode ser utilizada para a confirmação de *S. laeve* em nível de ordem e família, devido a conservação nucleotídica desta região do rDNA.

#### 4.3. Avaliação da expressão dos genes *ras* e *efl1a* por RT-PCR nas diferentes fases da associação ectomicorrízica entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*

Para a avaliação da expressão dos genes *ras* e *efl1a* nas diferentes fases da associação ectomicorrízica, as extrações de RNA total foram primeiramente padronizadas. A metodologia utilizada neste trabalho resultou em RNA total íntegro e em altas concentrações a partir do micélio fúngico e das ectomicorrizas. A Figura 12 apresenta as amostras do tratamento (plantas inoculadas) e dos controles (micélio fúngico) na concentração de 1 µg/µL.

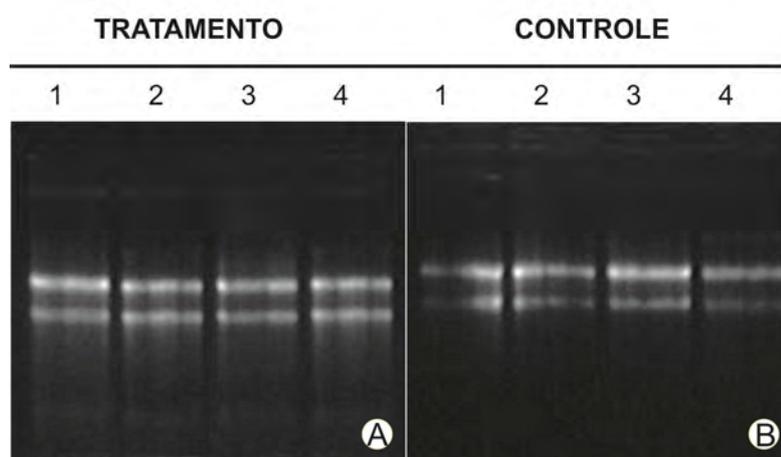


Figura 12: RNA total obtido a partir das ectomicorrizas e controle fúngico. Eletroforese em gel de agarose 1,2 % do RNA total obtido (A) RNA de plântulas inoculadas e RNA de micélio fúngico durante as fases pré-simbótica (1), iniciação (três dias) (2) intermediária (15 dias) e funcionamento (30 dias).

A detecção dos transcritos dos genes *ras* e *efl1a* foi realizada por meio da técnica de RT-PCR. As condições avaliadas foram referentes à resposta fúngica com as plântulas de *E. grandis* na fase pré-simbótica, e durante três, 15 e 30 dias após o contato físico entre fungo-plantas. Para confirmar que as alterações na expressão dos genes *ras* e *efl1a* estavam relacionadas à resposta de *S. laeve* durante a associação ectomicorrízica, vários controles experimentais foram realizados. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram testados em DNA e cDNA de *E.*

*grandis*, não sendo observada amplificações nestas amostras. Esses resultados evidenciaram a especificidade dos oligonucleotídeos pela sequências de *S. laeve*.

A expressão do gene *ras* em *S. laeve* foi detectado apenas nos três tempos após o contato físico entre fungo-planta. Nas amostras referentes ao controle fúngico, a expressão do gene *ras* não foi detectado em nenhum dos tempos avaliados (Figura 13 A). A expressão do gene *efl1a* em *S. laeve* foi detectado nas ectomicorrizas e nos controles fúngicos em todos os tempos avaliados (Figura 13 B).

Para verificar a homogeneidade da amostra foi realizado o RT-PCR do gene rRNA 17 S sendo detectado em todas as amostras utilizadas neste trabalho (Figura 13 C). A técnica de RT-PCR é capaz de detectar a presença dos genes *ras* e *efl1a*, mas a quantificação dos transcritos desses genes deverá ser confirmada por outras técnicas como, por exemplo, a técnica de PCR em tempo real.

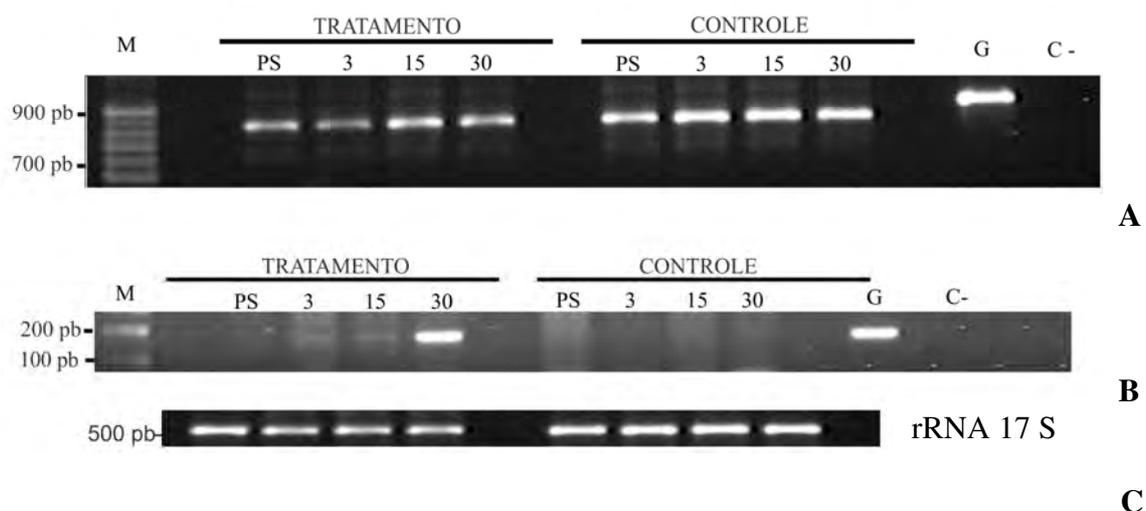


Figura 13: Expressão do gene *ras* e *efl1a* nas diferentes fases da associação ectomicorrízica entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis*. Detecção do transcrito do gene *ras* e *efl1a* em plântulas inoculadas (tratamento) e micélio fúngico (controle) na fase pré-simbiótica (PS), após três, 15 e 30 dias de contato com *Scleroderma laeve*. Expressão do gene *ras* (A), do gene *efl1a* (B) e do rRNA 17S utilizado como normalizador do RT-PCR (C). G – DNA genômico. M – marcador de tamanho, 100 pb DNA ladder (Promega Corporation, USA) e C - – Controle negativo.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho relata pela primeira vez o estabelecimento da micorrização *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*, o isolamento das sequências parciais de *ras* e *efla* do genoma de *S. laeve* e a avaliação da expressão dos genes *ras* e *efla* durante a associação ectomicorrízica. A micorrização *in vitro* permitiu avaliar as alterações morfológicas que ocorreram durante a formação das ectomicorrizas. O estabelecimento da formação das ectomicorrizas *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis* dependeu de algumas padronizações e otimizações. A metodologia utilizada para a micorrização *in vitro* pode alterar o tempo para a formação das ectomicorrizas entre as associações (Brun et al., 1995; Burgess et al. 1996). Neste trabalho, a micorrização *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis* pôde ser confirmada entre 15 e 30 dias da associação, quando as ectomicorrizas foram observadas nas fases de diferenciação e funcionamento. Metodologias para a síntese rápida e asséptica das ectomicorrizas têm sido utilizadas nas associações para os estudos de expressão gênica durante as fases da associação ectomicorrízica (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005). No entanto, como foi observada neste trabalho a formação das ectomicorrizas não são sincronizadas, mas os tempos definidos correspondem as alterações que ocorrem durante a formação das ectomicorrizas, permitindo avaliar a expressão gênica acompanhada das alterações morfológicas. A ausência da sincronia em estudos sobre a formação das ectomicorrizas e a aplicação destas para avaliar a expressão gênica também foi relatada para as associações entre *P. involutus* e *B. pendula* e *P. tinctorius* e *E. globulus* (Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005).

No estabelecimento da associação ectomicorrízica *in vitro* entre *S. laeve* e *E. grandis*, durante a fase pré-simbiótica e nas fases sucessivas após o contato físico, foram monitoradas as alterações morfológicas. As ectomicorrizas formadas apresentavam o manto fúngico e a rede de Hartig entre as células da epiderme, sendo estas as estruturas típicas das ectomicorrizas em angiospermas. Também observou-se o alongamento das células da epiderme vegetal, um maior número de raízes laterais e a diminuição dos pêlos radiculares existentes em plântulas de *E. grandis*, na presença do micélio fúngico. As primeiras alterações morfológicas que ocorrem nas associações ectomicorrízicas são respostas a ação de moléculas efetoras (Malajczuk et al., 1984; Massicote et al., 1987). Compostos fenólicos foram detectados nas associações entre *Hydnangium carneum*, *Amanita muscaria* e *Hebeloma crustuliniformi* com *Eucalyptus* favorecendo a formação ectomicorrízica. Estes compostos são encontrados na superfície radicular, inibindo fungos não compatíveis a associação e induzindo as alterações morfológicas nas células da epiderme radicular, para dar início a associação simbiótica com fungos compatíveis (Malajczuk et al., 1984). A inibição dos pêlos radiculares pode estar associada com a liberação de hipaforinas pelo fungo, como o relatado para associação entre *P. tinctorius* e *E. globulus*, no qual o desenvolvimento dos pêlos radiculares foi inibido (Ditengou & Lapeyrie, 2000). As alterações para a diminuição dos pêlos radiculares ocorrem nas vias das auxinas, onde as hipaforinas secretadas pelos fungos atuam como antagonistas ao ácido indolacético, induzindo as mudanças morfológicas nos pêlos radiculares (Martin et al., 2001). O aumento da formação das raízes laterais tanto nas fases de pré-simbiose e simbiose descrita para *L. bicolor* em interação com *Arabidopsis* e *Populus* foi devido ao acúmulo de auxinas, no qual induziu a maior formação das raízes laterais (Felten et al., 2009). O estabelecimento da associação ectomicorrízica *in vitro* e o acompanhamento dos processos neste estudo permitiu a avaliação da expressão gênica durante as fases de formação das ectomicorrizas, associadas com as alterações morfológicas e fisiológicas do processo.

Neste estudo foram isolados sequências parciais de 368 pb do gene *ras* e 879 pb do gene *efl1a* do fungo *S. laeve*. A amplificação dessas sequências foi possível, com base nas informações de sequências parciais relacionados a esses genes, que foram identificados em estudos funcionais de ectomicorrizas permitindo serem utilizados neste estudo (Martin et al., 2001; Sundaram et al., 2001; Voiblet et al.,

2001; Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005; Martin et al., 2008).

As análises *in silico* das sequências parciais dos genes que codificam as proteínas RAS e o EF1 $\alpha$  permitiram obter várias informações sobre estas sequências. O gene *ras* foi isolado e caracterizado entre os basidiomicetos apenas para *Ustilago maydis* (Lee et al., 2002), *T. hirsutus* (Yamazaki et al. 2004), *Lentinus edodes* (Hori et al., 1991) e *Laccaria bicolor*, um fungo ectomicorrízico (Sundaram et al., 2001). A análise da sequência putativa de aminoácidos da proteína RAS de *S. laeve* permitiu a confirmação do gene isolado neste trabalho. A partir da sequência de aminoácidos putativa foram detectados os sítios de ligação ao efetor e os domínios de ligação ao GTP (G4 box). As proteínas RAS possuem quatro sequências de aminoácidos consenso responsáveis pela interação específica com GDP, GTP e para a atividade de GTPase, na qual hidrolisa as ligações GTP em GDP + Pi. Também são encontrados regiões de interação de efetores à jusante aos sítios de ligação ao GTP (Takai et al., 2001). A sequência consenso NKXD corresponde aos domínios de ligação ao GTP (G4 box) identificado neste trabalho foi também detectado na sequência de aminoácidos de *L. bicolor* (Sundaram et al., 2001) e de *T. hirsutus* (Yamazaki et al., 2004).

Os transcritos do gene *ras* foram detectados durante as quatro fases da associação avaliadas neste trabalho, sendo detectado no controle do micélio fúngico, somente na fase pré-simbiótica. Os genes envolvidos nas vias de transdução de sinais têm sido detectados em várias associações ectomicorrízicas, sendo diferencialmente expressos (Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005). Durante a associação entre *L. bicolor* e *P. resinosa*, o gene *ras* não foi detectado no micélio em vida livre, entretanto, após 48 horas de contato com as raízes foi observado a presença do transcrito deste gene. A presença de elicitores nos primeiros momentos da interação ectomicorrízica ativa uma cascata de sinalização para favorecer as sucessivas fases da associação ectomicorrízica (Martin, et al., 2001; Sundaram et al., 2001). O desenvolvimento das ectomicorrizas e a regulação das atividades fisiológicas requerem que, os fungos envolvidos na simbiose respondam adequadamente às alterações do ambiente e à presença do hospedeiro (Rajashekar et al., 2009). Os genes *ras* têm sido caracterizados envolvidos em diversas funções como a progressão e divisão celular, morfologia e patogenicidade (Alspaugh et al., 2002; Lee et al., 2002; Waugh et al. 2002). Os mecanismos moleculares das vias de

transdução de sinais não têm sido caracterizados para fungos ectomicorrízicos, dificultando o entendimento das funções destes genes durante a associação (Martin et al., 2007; Rajashekar et al., 2009).

O fator de alongação *ef1a* isolado neste trabalho possui em sua sequência parcial um íntron de aproximadamente 130 pb. Este gene foi isolado e caracterizado para os basidiomicetos, *S.commune* e *P.graminis*. No fungo, *P.graminis* a sequência codificadora completa possui 1389 pb, interrompida por sete íntrons e codifica para uma proteína de 463 aminoácidos. Em *S. commune*, o gene isolado possui 1380 pb, interrompidos por oito íntrons e codificam para uma proteína de 460 aminoácidos. Para os genes *ef1a* de *A. gossypii*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* não foram encontrados íntrons (Wendland et al., 2004; Schillberg et al., 2005).

A detecção do transcrito do gene *ef1a* ocorreu durante as quatro fases avaliadas neste trabalho. Na formação e funcionamento das ectomicorrizas são relatados a expressão diferencial de genes envolvidos com processo de síntese protéica durante a formação das ectomicorrizas (Martin & Hilbert, 1999; Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005; Le Queré et al., 2005; Morel et al., 2005; Coelho et al., 2010). Podila et al., 2002 identificaram vários genes relacionados com a síntese e transporte de proteínas e verificou a alteração na expressão destes genes quando na formação das ectomicorrizas. A ativação de genes que codifica proteínas do processo de síntese protéica suporta o fato que as células alteram a estrutura e o metabolismo para formar as ectomicorrizas (Morel et al., 2005).

A avaliação da expressão diferencial de genes durante a interação entre *S. laeve* e *E. grandis* é o primeiro passo para o entendimento dessa associação, sendo requisito fundamental, o isolamento desses genes e o estabelecimento da associação ectomicorrízica. Desse modo, este conhecimento auxiliará na elucidação de como a expressão destes genes respondem às alterações morfológicas, mesmo quando ainda não ocorreu o contato físico entre fungo-planta.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A micorrização *in vitro* entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis* foi estabelecido pela primeira vez.

As ectomicorrizas formadas entre *S. laeve* e *E. grandis* por meio da micorrização *in vitro* foram confirmadas pela presença das estruturas características como o manto fúngico, rede de Hartig e diferenciação das células radiculares.

As sequências parciais dos genes *ras* e *ef1a*, apresentando tamanho de 367 e 879 pb, respectivamente, foram isolados do genoma do fungo ectomicorrízico *S. laeve*, apresentando identidade com sequências relacionadas a esses genes em outros fungos.

A expressão do gene *ef1a* foi detectada durante todos os períodos de avaliação da formação ectomicorrízica entre *S. laeve* e *E. grandis* e controles fúngicos.

O gene *ras* foi expresso apenas nos tempos após o contato físico entre *S. laeve* e *E. grandis*, sugerindo que este gene possa ser ativado durante a interação entre fungo-planta.

A variação da expressão dos genes detectados neste trabalho não pôde ser confirmada utilizando a técnica de RT-PCR, sendo necessária a utilização de técnicas de análises quantitativas da expressão, como a técnica de PCR em tempo real.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLI-SANTOS, B., SEBASTIANA, M., PESSOA, F., SOUSA, L., FIGUEIREDO, A., FORTES, A.M., BALDE, A., MAIA, L.C., PAIS, M.S., 2008, Fungal transcript pattern during the preinfection stage (12 h) of ectomycorrhiza formed between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* roots, identified using cDNA microarrays. **Current Microbiology** 57, 620-625.
- ALSPAUGH, J.A., CAVALLO, L.M., PERFECT, J.R., HEITMAN, J., 2000, RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology** 36, 352-365.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25, 3389-33902.
- BAPTISTA, M.J.; GLORIA, B.A.; PASCHOLATI, S.F. & KRUGNER, T.L., 1999. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica** 22, 309-315.
- BASEIA, I.G., MILANEZ, A.I., 2000, First record os *Scleroderma polyhizum* Pers.(Gasteromycetes) from Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 14, 181-184.
- BEGUIRISTAIN, T., COTE, R., RUBINI, P., JAYALLEMAND, C., LAPEYRIE, F., 1995, Hypaphorine Accumulation in Hyphae of the Ectomycorrhizal Fungus, *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry** 40, 1089-1091.

- BINDER, M., HIBBETT, D.S., 2006, Molecular systematics and biological diversification of Boletales. **Mycologia** 98, 971-981.
- BONFANTE, P.; ANCA, I. 2009 Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. **Annual Review of Microbiology** 63, 63–83.
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., MCCORMICK, F., 1990, The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature** 348, 125-132.
- BRUN, A., CHALOT, M., FINLAY, R.D., SÖDERSTRÖM, B., 1995, Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* (Roth). I Dynamics of mycorrhiza formation. **New Phytologist** 129, 487-493.
- BRUNDRETT, M., 2004, Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews** 79, 473-495.
- BRUNDRETT, M.C., 2009, Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant Soil** 320, 37–77.
- BRUNDRETT, M.C., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T., MALAJCZUK, N., 1996, **Working with mycorrhizas in forest and agriculture**. ACIAR Monograph. Canberra: Pirie, 374 p.
- BURGESS, T., DELL, B., MALAJCZUK, N., 1996, *In vitro* synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. **Mycorrhiza** 6, 189-196.
- CAMPOS, D.T.S. **Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto**. 82 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- CHAMBERS, S.M., CAIRNEY, J.W.G., 1999. *Scleroderma*. In: Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (Eds.), **Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile**. Springer-Verlag, Berlin, 188-197.
- CHANG, S., PURYEAR, J., CAIRNEY, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Reporter** 11, 113-116.
- CHEN, Y.L., KANG, L.H., MALAJCZUK, N., DELL, B., 2006. Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in south China: effect of

*Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliottii*, and *P. radiata*. **Mycorrhiza** 16, 251–259.

- CHEN, Y.L., LIU, S., DELL, B., 2007. Mycorrhizal status of *Eucalyptus* plantations in south China and implications for management. **Mycorrhiza** 17, 527–535
- COELHO, F.C., BORGES, A.C., NEVES, J.C.L., BARROS, N.F., MUCHOVEJ, R.M., 1997, Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., nos municípios de Paraopeba, Bocaiúva e João Pinheiro, Minas Gerais. **Revista Árvore** 21, 393 - 404.
- COELHO, I.S., QUEIROZ, M.V., COSTA, M.D., KASUYA, M.C.M., ARAUJO, E.F., 2010, Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza** 20, 531-540.
- CORTEZ, V.G., BASEIA, I.G., SILVEIRA, R.M., 2008, Gasteromicetos (Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 6, 291-299.
- CORTEZ, V.G., BASEIA, I.G., SILVEIRA, R.M.B., 2011, Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research** 2, 44 -52.
- COSTA, M.D., PEREIRA, O.L., KASUYA, M.C.M., BORGES, A.C, 2002, Ectomicorrizas: A Face Oculta das Florestas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 29, 38 - 46.
- DITENGOU, F.A., LAPEYRIE, F. 2000, Hypaphorine from the Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius* Counteracts Activities of Indole-3-Acetic Acid and Ethylene but Not Synthetic Auxins in *Eucalypt* Seedlings. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13, 151-158.
- DUPLESSIS, S., COURTY, P.E., TAGU, D., MARTIN, F., 2005, Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist** 165, 599-611.
- FELTEN, J., KOHLER, A., MORIN, E., BHALERAO, R.P., PALME, K., MARTIN, F., DITENGOU, F.A., LEGUE, V., 2009, The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and

- Arabidopsis* through auxin transport and signaling. **Plant Physiology** 151, 1991-2005.
- FENG, Q.H., SUMMERS, E., GUO, B., FINK, G., 1999, Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology** 181, 6339-6346.
- FERNANDES, L., PAES, H.C., TAVARES, A.H., SILVA, S.S., DANTAS, A., SOARES, C.M., TORRES, F.A., FELIPE, M.S., 2008, Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Research** 8, 300-310.
- FRETTINGER, P., DERORY, J., HERRMANN, S., PLOMION, C., LAPEYRIE, F., OELMULLER, R., MARTIN, F., BUSCOT, F. 2007, Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. **Plant** 225, 331-340.
- GAY, G.; NORMAND, L.; MARMEISSE, R.; SOTTA, B.; DEBAUD, J.C.; 1994. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. **New Phytologist**. 128: 645–657.
- GIACHINI, A.J., SOUZA, L.A., OLIVEIRA, V.L. 2004, Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza** 14, 375-381.
- GUIMARÃES, L. G. **Caracterização de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus* spp. em Aracruz e São Mateus, Espírito Santo e Dionísio, Minas Gerais**. Viçosa - MG: UFV, 1993. 46. Microbiologia Agrícola - UFV, 1993.
- GLOWA, K.R.; AROCENA, J.M.; MASSICOTTE, H.B. 2003, Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*. **Geomicrobiology Journal**, 20, 99-111.
- GUZMÁN, G. Monografía del género *Scleroderma* Pers. emend Fr. (Fungi-Basidiomycetes). **Darwiniana**, v. 16, p. 233 - 407, 1970.
- HA, Y.S., MEMMOTT, S.D., DICKMAN, M.B., 2003, Functional analysis of Ras in *Colletotrichum trifolii*. **FEMS Microbiology Letters** 226, 315-321.
- HARRISON, M.J., 2005, Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review Microbiology** 59, 19-42.

- HILBERT, L.J., MARTIN, F., 1988, Regulation of gene expression in ectomycorrhizas I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis **New Phytology** 110, 339-346.
- HILBERT, J.L., COSTA, G., MARTIN, F., 1991, Ectomycorrhizin Synthesis and Polypeptide Changes during the Early Stage of *Eucalypt* Mycorrhiza Development. **Plant Physiology** 97, 977-984.
- HORI K, KAJIWARA S, SAITO T, MIYAZAWA H, KATAYOSE Y, SHISHIDO K., 1991 Cloning, sequence analysis and transcriptional expression of a *ras* gene of the edible basidiomycete *Lentinus edodes*. **Gene** 105,91–96.
- INDEX FUNGORUM. **Genus** *Scleroderma*. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acessado em 04 de Julho de 2011.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H., 1990, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene** 96, 23-28.
- JOHANSEN, D.A., 1940, **Plant microtechnique**. MacGraw-Hill, New York.
- JONESON, S., ARMALEO, D., LUTZONI, F., 2011, Fungal and algal gene expression in early development stages of lichen-symbiosis. **Mycologia** 103, 291-306.
- KANA-UCHI, A., YAMASHIRO, C.T., TANABE, S., MURAYAMA, T., 1997, A *ras* homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. **Molecular and General Genetics** 254, 427-432.
- KRPATA, D., PEINTNERA, U., LANGERB, I., FITZ, W.J., SCHWEIGER, P., 2008, Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. **Micologic Research** 112, 1069-1079.
- KIM, S.J., ZHENG, J., HIREMATH, S.T., PODILA, G.K., 1998, Cloning and characterization of a symbiosis-related gene from an ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Gene** 222, 203-212.
- KRUGER, A., PESKAN-BERGHOFER, T., FRETTEINGER, P., HERRMANN, S., BUSCOT, F., OELMULLER, R., 2004, Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. **New Phytologist** 163, 149-157.

- LANDERWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R. D.; KUYPER, T. W.; VAN BREEMEN, N., 2001, Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. **Trends in Ecology and Evolution** 16, 248-254.
- LAMMERS, P.J., 2004, Symbiotic signaling: new functions for familiar proteins. **New Phytologist** 161, 324-326.
- LEE, N., KRONSTAND, W., 2002, *ras2* Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. **Eukaryotic Cell** 1, 954-966.
- LE QUERÉ, A., WRIGTH, D.P., SÖDERSTRÖM, B., TUNLID, A., JOHANSSON, T., 2005, Patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between Birch (*Betula pendula* Roth) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. **Molecular Plant Microbe Interactions** 18, 659–673.
- LEBERER, E., HARCUS, D., DIGNARD, D., JOHNSON, L., USHINSKY, S., THOMAS, D.Y., SCHROPPEL, K., 2001, Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signaling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Microbiology** 42, 673–687.
- LINZ, J.E., SYPHERD, P.S., 1987, Expression of Three Genes for Elongation Factor *lax* during Morphogenesis of *Mucor racemosus*. **Molecular and Cellular Biology**, 1925-1932.
- LÒPEZ, F., M., MÄNNER, P., WILLMANN, A., HAMPP, R., NEHLS, U., 2007, Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. **New Phytologist** 174, 389-398.
- LU, X. H., MALAJCZUK, N., DELL B., 1998, Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza** 8,81–86
- MALAJCZUK, N., MOLINA, R., TRAPPE, J.M., 1982 Ectomycorrhiza Formation in *Eucalyptus*. I. Pure Culture Synthesis, Host Specificity and Mycorrhizal Compatibility with *Pinus radiata*. **New Phytologist** 91, 467-482
- MALAJCZUK, N., MOLINA, R., TRAPPE, J.N., 1984, Ectomycorrhiza Formation in *Eucalyptus*. II. The Ultrastructure of Compatible and Incompatible Mycorrhizal Fungi and Associated Roots. **New Phytologist** 96, 43-53

- MANKEL, A., KRAUSE, K., KOTHE, E., 2002, Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 1408-1413.
- MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M.K.; DEWEESE SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R.C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C.J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; OMELCHENKO, M. V.;ROBERTSON, C.L.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; ZHANG, D.;ZHANG, N.; ZHENG, C.; BRYANT, S.H. 2010, CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research** 39, 225-229.
- MARTIN F, TAGU, D. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In: Varma, A.K. & Hock, B. Mycorrhiza: Structure, Function, **Molecular Biology and Biotechnology**. 1999 Springer-Verlag Berlin Heidelberg,. 51-73
- MARTIN, F., DUPLESSIS, S., DITENGOU, F., LAGRANGE, H., VOIBLET, C., LAPEYRIE, F., 2001, Development cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. **New Phytologist** 151, 145-154.
- MARTIN, F., HILBERT, J.L., 1999, Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. **Experientia** 47, 321-331.
- MARTIN, F., KOHLER, A., DUPLESSIS, S. 2007. Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. **Current Opinion in Plant Biology** 10, 204-210.
- MARTIN, F., AERTS, A., AHREN, D., BRUN, A., DANCHIN, E.G., DUCHAUSSOY, F., GIBON, J., KOHLER, A., LINDQUIST, E., PEREDA, V., SALAMOV, A., SHAPIRO, H.J., WUYTS, J., BLAUDEZ, D., BUEE, M., BROKSTEIN, P., CANBACK, B., COHEN, D., COURTY, P.E., COUTINHO, P.M., DELARUELLE, C., DETTER, J.C., DEVEAU, A., DIFAZIO, S., DUPLESSIS, S., FRAISSINET-TACHET, L., LUCIC, E., FREY-KLETT, P., 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., NICULITA-HIRZEL, H., OUDOT-LE SECQ,

- M.P., PETER, M., QUESNEVILLE, H., RAJASHEKAR, B., REICH, M., ROUHIER, N., SCHMUTZ, J., YIN, T., CHALOT, M., HENRISSAT, B., KUES, U., LUCAS, S., VAN DE PEER, Y., 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., 2008, The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature** 452, 88-92.
- MARX, D.H., 1969, The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. **Phytopathology** 59, 411-417.
- MASSICOTTE, H. B., PETERSON, R. L., ACKERLEY, A., ASHFORDA, A. E., 1987. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis* - *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. **Canadian Journal Botany** 65, 1940- 1947.
- MELLO A. H., ANTONIOLLI, Z.I., KAMINSKI, J., SOUZA E.L., OLIVEIRA, V.L., 2006. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, 16, 293-301.
- MENOTTA, M., AMICUCCI, A., SISTI, D., GIOACCHINI, A.M., STOCCHI, V., 2004, Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. **Current Genetics** 46, 158-165.
- MICHELMORE, R.W.; HULBERT, S.H. Molecular markers for genetics analysis of phytopathogenic fungi. Annual Review **Phytopathology**, v. 25, p. 383-404, 1987.
- MOREL, M., JACOB, C., KOHLER, A., JOHANSSON, T., MARTIN, F., CHALOT, M., BRUN, A., 2005, Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus*-*Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology** 71, 382-391.
- NITSCHKE, E., NIHLGARD, M., VARRELMANN, M., 2009. Differentiation of Eleven *Fusarium* spp. Isolated from Sugar Beet, Using Restriction Fragment Analysis of a Polymerase Chain Reaction–Amplified Translation Elongation Factor 1 $\alpha$  Gene Fragment. **Phytopathology** 99, 921-929.

- NEHLS, U., GOHRINGER, F., WITTULSKY, S., DIETZ, S., 2010, Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. **Plant Biology** 12, 292-301.
- NIETO, M., P., CARBONE, S.S., 2009, Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. **Mycorrhiza** 19, 91-98.
- O'BRIEN, T. P.; MCULLY, M. E. **The study of plant structure, principles and selected methods.** Melbourne, Australia: Termarcarphi Pty. Ltd.; 1981. 345p.
- O'DONNELL, K., GUEIDAN, C., SINK, S., JOHNSTON, P.R., CROUS, P.C., GLENN, A., RILEY, R. ZITOMER, N. C., COLYER, P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T., MORETTI, A., KANG, S., KIM, H. S., GEISER, D.M., JUBA, J.H., BAAYEN, R.P. CROMEY, M.G., BITHELL, S., SUTTON, D.A., SKOVGAARD, K., PLOETZM, R., KISTLER, C., ELLIOTT, M., DAVIS, M., SARVER, A.J., 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal Genetics and Biology** 46, 936–948.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHIMIDT, N.C.; GOMES, N.C. & MAIA, D.C., 1994, Spécificité de champignons ectomycorrhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie** 14, 57-62,
- OLIVEIRA, V. L., OLIVEIRA, L.P., ROSSI, M. J. **Ectomicorrizas no Brasil: diversidade de fungos e aplicação.** In: Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. eds. Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil 2010. Brasil, Editora UFLA, 2010.p.615-643.
- PEREIRA, O.L., COSTA, M.D., BORGES, A.C., ARAÚJO, E.F., KASUYA, M.C.M., 2005, Compatibility and ectomycorrhiza formation among *Pisolithus* isolates and *Eucalyptus* spp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29, 337-344.
- PEREZ-GARCIA, A., SNOEIJERS, S.S., JOOSTEN, M.H.A.J., GOOSEN, T., DE WIT, P.J.G.M., 2001, Expression of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. **Molecular Plant Microbe Interactions** 14, 316-325.
- PETER, M., COURTY, P.E., KOHLER, A., DELARUELLE, C., MARTIN, D., TAGU, D., FREY-KLETT, P., DUPLESSIS, A., CHALOT, M., PODILA, G.K., MARTIN, F., 2003, Analysis of expressed sequence tags from the

- ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist** 159, 117-129.
- PETERSON, R.L., MASSICOTE, H.B., MELVILLE, L.H., 2003, **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. National Research Council of Canada, Ottawa, 173 p.
- PHOSRI, C., MARTIN, M.P., WATLING, R., JEPPSON, M., SIHANONTH, P., 2009, Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (Gasteromycetes). **Anales del Jardín Botánico de Madrid** 66, 83-91.
- PODILA, G.K., ZHENG, J., BALASUBRAMANIAN, S., SUNDARAM, S., HIREMATH, S., BRAND, J., HYMES, M., 2002, Molecular interactions in ectomycorrhizas: identification of fungal genes involved in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant Soil** 244, 117-128.
- POLIDORI, E., AGOSTINI, D., ZEPPA, S., POTENZA, L., PALMA, F., SISTI, D., STOCCHI, V., 2002, Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos* -*Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. **Molecular Genetic Genomics** 266, 858-864.
- RAJASHEKAR, B., KOHLER, A., JOHANSSON, T., MARTIN, F., TUNLID, A., AHREN, D., 2009, Expansion of signal pathways in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*- evolution of nucleotide sequences and expression patterns in families of protein kinases and RAS small GTPases. **New Phytologist** 183, 365-379.
- RIBEIRO, J.J.O. **Isolamento e caracterização de ectomicorrizas em Nogueira Pecã**. 31p Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG,2001.
- RIIS, B., RATTAN, S.I.S., CLARK, B.F.C., 1990, Eukaryotic protein elongation factors. **Trends in Biochemical Sciences** 15, 420-424
- RINALDI, A.C., COMANDINI, O., KUYPER, T.W., 2008, Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. **Fungal Diversity** 33, 1-45.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989, **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., 1977, **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences. Sci. USA 74, 5463-5467.

- SANON, B.K., BÂ, M.A., DELARUELLE, C., DUPONNOIS, R., MARTIN, F. 2009, Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinoid legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. **Mycorrhiza**, 19 571–584.
- SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G., 2003, Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. **Australian Journal of Botany**, 51, 151-158.
- SCHEFFZEKA, K., AHMADIANB, M. R., 2005, GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62 3014–3038.
- SILAR, P., LALUCQUE, H., HAEDENS, V., ZICKLER, D., PICARD, M., 2001, EF1A controls ascospore differentiation through elevated accuracy, but controls longevity and fruiting body formation through another mechanism in *Podospora anserina*. **Genetics** 158, 1477-1489.
- SIMS, K., WATLING, R., DELACRUZ, R., JEFFRIES, P., 1997, Ectomycorrhizal fungi of the Philippines: A preliminary survey and notes on the geographic biodiversity of the Sclerodermatales. **Biodiversity and Conservation** 6, 45-58.
- SIMS, K.P., SEN, R., WATLING, R., JEFFRIES, P., 1999, Species and population structures of *Pisolithus* and *Scleroderma* identified by combined phenotypic and genomic marker analysis. **Mycological Research** 103, 449-458.
- SCHILLBERG, S., GROÛ, P. & TIBURZY, R. 1995, Isolation and characterization of the EF-1a gene of the filamentous fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici. **Current Genetics** 27, 367-372.
- SCHIRMAIER, F., PHILIPPSEN, P., 1984, Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 a of *S. cerevisiae*. **The EMBO Journal** 3, 3311 -3315.
- SMITH, S. E. & READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. London: Academic Press, 2008. 605p.
- SOM, T., KOLAPARTHI, V.S.R., 1994, Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. **Molecular and Cellular Biology**. 14, 5333–5348.

- SOUZA, V.C., SILVA, R.A., CARDOSO, G.D., BARRETO, A.F., 2006, Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 3, 612-618.
- SUNDARAM, S., BRAND, J., HYMES, M., HIREMATH, S., PODILA, G.K., 2003, Isolation and analysis of a symbiosis-regulated and Ras-interacting vesicular assembly protein gene from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist** 161, 529-538.
- SUNDARAM, S., KIM, S.J., SUZUKI, H., MCQUATTIE, C.J., HIREMAH, S.T., PODILA, G.K., 2001, Isolation and characterization of a symbiosis-regulated *ras* from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Molecular Plant Microbe Interact** 14, 618-628.
- TAGU, D., LAPEYRIE, F., MARTIN, F., 2002, The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. **Plant and Soil** 244, 97–105.
- TAKAI, Y., SAZAKI, T., MATOZAKI, T., 2001. Small GTP-Binding Proteins. **Physiological Reviews** 81, 153-208.
- TAYLOR, F.S.A., ALEXANDER, I., 2005, The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. **Mycologist** 19, 102-112.
- TEDERSOO, L., MAY, T.W., SMITH, M.E., 2010, Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza** 20, 217-263.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., 2002, Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Current Protocol Bioinformatics** Chapter 2, Unit 2.3.
- VAN'T KLOOSTER, J.W., VAN DEN BERG-VELTHUIS, G., VAN WEST, P., GOVERS, F., 2000, *tef1*, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 alpha. **Gene** 249, 145-151.
- VAN BUUREN, M.L., LANFRANCO, L., LONGATO, S., MINERDI, D., HARRISON, M.J., BONFANTE, P., 1999, Construction and characterization of genomic libraries of two endomycorrhizal fungi: *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*. **Mycological Research** 103, 955-960.
- VOIBLET, C., DUPLESSIS, S., ENCELOT, N., MARTIN, F., 2001, Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **Plant Journal** 25, 181-191.

- VOJTEK, A.B., DER, C.J., 1998, Increasing complexity of the Ras signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry** 273, 19925-19928.
- WAUGH, M.S., NICHOLS, C.B., DECESARE, C.M., COX, G.M., HEITMAN, J., ALSPAUGH, J.A., 2002, Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology** 148, 191-201.
- WEIDMANN, S., SANCHEZ, L., DESCOMBIN, J., CHATAGNIER, O., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V., 2004, Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant Microbe Interact** 17, 1385-1393.
- WEISS, M., SELOSSE, M.A., REXER, K.H., URBAN, A., OBERWINKLER, F., 2004, Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. **Mycological Research** 108, 1003-1010.
- WENDLAND, J., KOTHE, E., 1997, Isolation of *tef1* encoding translation elongation factor EF1  $\alpha$  from the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. **Mycological Research** 101, 798-802.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., White, T.J., eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic.
- YAMAZAKI, T., KIYOFUJI, T., JOHJIMA, T., KAJIWARA, S., TSUKAMOTO, A., SUGIURA, J., SHISHIDO, K. 2004, Isolation of a *ras* gene from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and use of its promoter for the expression of *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase cDNA in *C. hirsutus*. **Mycoscience** 45,317-323.
- YAN, H.Z., LIOU, R.F., 2006, Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. **Fungal Genet Biology** 43, 430-438.
- ZARETSKY, M., SITRIT, Y., MILLS, D., ROTH-BEJERANO, N., KAGAN-ZUR, V., 2006, Differential expression of fungal genes at preinfection and mycorrhiza establishment between *Terfezia boudieri* isolates and *Cistus incanus* hairy root clones. **New Phytologist** 171, 837-846.

ZUCCARO, A., BASIEWICZ, M., ZURAWSKA, M., BIEDENKOPF, D., KOGEL, K.H., 2009, Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. **Fungal Genetics and Biology** 46, 543-550.