

**IRENE DA SILVA COELHO**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DURANTE A FASE PRÉ-SIMBIÓTICA DA ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA ENTRE *Hydnangium* sp. E *Eucalyptus grandis* E TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**

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

**VIÇOSA  
BRASIL - MINAS GERAIS  
2008**

IRENE DA SILVA COELHO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DURANTE A FASE PRÉ-SIMBIÓTICA DA ASSOCIAÇÃO ECTOMICORRÍZICA ENTRE *Hydnangium* sp. E *Eucalyptus grandis* E TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS**

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

APROVADA: 27 de novembro de 2008.

---

Prof.<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Co-orientadora)

---

Prof. Maurício Dutra Costa  
(Co-orientador)

---

Prof. Júlio César de Mattos Cascardo

---

Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel

---

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

*A minha querida tia Irene pelo amor incondicional, pela confiança, pela compreensão e pelo suporte nas horas difíceis.*

*- Ofereço -*

*Àquela que sempre me estimulou a dar este grande passo. Que com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação esteve ao meu lado, me encorajando nas horas difíceis e compartilhando os momentos de sucesso, minha Querida Orientadora, Elza Fernandes de Araújo.*

*- Dedico -*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Departamento de Microbiologia, pelo acolhimento e incentivo acadêmico.

À FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela orientação, pela confiança e pelo exemplo de amor ao trabalho.

Aos professores Marisa Vieira de Queiroz, Maurício Dutra Costa e Maria Catarina Megumi Kasuya, pela confiança, pela constante colaboração neste trabalho e por todos os ensinamentos e carinho, especialmente nas disciplinas.

Aos professores Júlio César de Mattos Cascardo e Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pela participação na banca examinadora.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Danilo, Evandro, Toninho, Paulo Rosa, Nilcéia e Laura, sempre tão gentis.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, pela ótima convivência, pelas discussões, pelas conversas sempre

agradáveis, pelos vários cafés, pelas confidências, pelos sorrisos de afeto, pelas palavras confortantes nos momentos difíceis que enfrentamos no dia-a-dia do laboratório. Foi um prazer trabalhar ao lado de vocês.

Aos queridos alunos de iniciação científica, Darlene, Fábio e Mariane, pela dedicação, pelo companheirismo e pelo apoio sempre.

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

À grande amiga Ritinha, pelo carinho, pela dedicação, pela cumplicidade, pelo companheirismo e pelo apoio sempre. À minha segunda família, Tia Izilda, Tio Neném, Cecília e Júnior, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio constante.

Às queridas amigas Jana e Si, pelo carinho sempre, por terem acreditado no meu sonho. Desculpem os momentos de ausência.

À eterna amiga Patty (*in memoriam*), exemplo de vida, pela presença constante, mesmo distante. Essa vitória é sua também.

Às minhas queridas companheiras, Cynthia, Liziane e Mirelle, pelos maravilhosos momentos compartilhados em nossa casa.

À querida Vovózinha Maria, Marcinha e Zezinho. Foi importante saber que sempre pude contar com vocês. Obrigada pelo apoio sempre.

À minha querida Dadá e seus familiares, que sempre me apoiaram e me auxiliaram, principalmente com meu “Pequeno”.

Às minhas queridas tias Irene, Alvair e Lúcia, e ao meu tio Walter, pela criação, pelo exemplo de honestidade, pelo amor sempre.

Ao querido Léo, por todo apoio e carinho sempre.

Ao meu querido Gui, minha fonte inspiradora.

E a todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

E acima de tudo, a Deus, que por seu amor incondicional, providenciou tudo do que precisei.

## **BIOGRAFIA**

Irene da Silva Coelho, filha de Aparecido Gonçalves Coelho e Maria das Graças Silva Lima, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, no dia 6 de dezembro de 1979. Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se, em fevereiro de 2003, em Agronomia. Em março de 2003, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2005. Em março de 2005, iniciou o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1 - Expressão diferencial de genes do fungo <i>Hydnangium</i> sp. na fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica com <i>Eucalyptus grandis</i> .....	
1.RESUMO.....	28
2.INTRODUÇÃO.....	29
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1.Microrganismos e condições de cultivo.....	34
3.2.Interações entre <i>Hydnangium</i> sp. e <i>Eucalyptus grandis in vitro</i> .....	34
3.3.Construção da biblioteca subtrativa supressiva.....	35
3.4.Teste de eficiência da hibridização subtrativa.....	36
3.5.Clonagem do produto final da hibridização subtrativa supressiva no vetor pGEM-T Easy e seqüenciamento.....	37
3.6.Anotações das seqüências da biblioteca subtrativa.....	38
3.7.Validação da biblioteca subtrativa da interação pré-simbiótica de <i>Hydnangium</i> sp. e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	38
4.RESULTADOS.....	41
4.1.Possíveis proteínas detectadas <i>in silico</i> a partir das análises dos genes diferencialmente expressos na fase pré-simbiótica entre <i>Hydnangium</i> sp. e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	45
4.1.1.Metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético.....	45
4.1.2.Transcrição e síntese de proteínas.....	46
4.1.3.Comunicação celular, transdução de sinal e resposta a estresse.....	46
4.1.4.Transposons e biogênese de componentes celulares.....	48
4.1.5.Proteínas com função não conhecida.....	50
4.2.Validação da biblioteca subtrativa da interação pré-simbiótica entre <i>Hydnangium</i> sp. e <i>Eucalyptus grandis</i> .....	51
5.DISSCUSSÃO.....	53
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

CAPÍTULO 2 - Transformação de fungos ectomicorrízicos.....	64
1.RESUMO.....	65
2.INTRODUÇÃO.....	67
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.1.Microrganismos e condições de cultivo.....	73
3.2.Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo <i>Hydnangium</i> sp.....	74
3.3.Transformação de fungos ectomicorrízicos mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	75
3.3.1.Teste de resistência a agentes seletivos.....	75
3.3.2.Transformação do fungo <i>Hydnangium</i> sp. mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	76
3.3.3.Confirmação da presença dos genes <i>bar</i> e <i>vir</i> nos plasmídeos das estirpes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	77
3.3.4.Teste de inibição do crescimento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>Escherichia coli</i> por <i>Hydnangium</i> sp.....	78
3.3.5.Transformação do fungo <i>Laccaria laccata</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	79
3.3.6.Estabilidade mitótica.....	79
3.3.7.Análise dos transformantes.....	80
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4.1.Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo <i>Hydnangium</i> sp.....	81
4.2.Transformação do fungo <i>Hydnangium</i> sp. mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	86
4.3.Transformação do fungo <i>Laccaria laccata</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	94
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
3.CONCLUSÕES GERAIS.....	107



## RESUMO

COELHO, Irene da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2008. **Identificação de genes expressos durante a fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* e transformação de fungos ectomicorrízicos.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo, Co-Orientadores: Marisa Vieira Queiroz e Maurício Dutra Costa.

A expressão de genes do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica foi avaliada utilizando-se a técnica de micorrização *in vitro* visando a construção de uma biblioteca subtrativa supressiva de cDNA. O fungo foi cultivado na presença de raízes de *Eucalyptus grandis*, sem, no entanto, haver contato direto das hifas com o sistema radicular da planta hospedeira. Foram identificados genes que codificam possíveis proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético, transcrição e síntese de proteínas, comunicação celular, transdução de sinal, resposta a estresse, transposons e proteínas relacionadas à biogênese de componentes celulares. A expressão dos genes que codificam piruvato desidrogenase, ATP sintase, proteína do canal seletivo de íon dependente de voltagem, acetil-CoA acetiltransferase e hidrofobina foi avaliada por RT-PCR quantitativo. A expressão diferencial destes genes durante a fase pré-simbiótica confirmou a ativação dos genes relacionados à beta-oxidação e ao metabolismo mitocondrial, além de validar a biblioteca subtrativa supressiva

construída. A construção da biblioteca subtrativa de *Hydnangium* sp. possibilitará o estudo de diferentes genes relacionados à micorrização, auxiliando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na associação ectomicorrízica. Para a transformação de *Hydnangium* com PEG/CaCl<sub>2</sub> foi necessário otimizar as condições de obtenção e regeneração de protoplastos. A maior produção de protoplastos, 1,06 x 10<sup>7</sup> protoplastos/mL, foi obtida após duas horas em KCl 0,6 M, na presença de 20 mg/mL da preparação hidrolítica “Lysing Enzymes” e 0,3 g de micélio fúngico com dois dias de idade. Para regeneração de protoplastos foram testados diferentes estabilizadores osmóticos, concentrações de ágar no meio MNM e tempos de incubação da preparação hidrolítica. Entretanto, até o presente momento, não foram estabelecidas as condições que permitissem a regeneração dos protoplastos de *Hydnangium* sp. Para o estabelecimento da transformação de *Hydnangium* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* vários parâmetros foram testados, mas não foi possível a transformação desse fungo. Uma das razões desse insucesso pode ser devido a inibição da agrobactérias testadas pelo *Hydnangium* sp. A transformação do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* mediada por *A. tumefaciens* foi estabelecida com uma eficiência de transformação de 32,6 %. A integração do gene *hph* no genoma das linhagens transformantes foi confirmada pela detecção de um fragmento de DNA de 690 pb que corresponde ao tamanho esperado. Os transformantes, com cópia única do T-DNA inserida no genoma, serão testados quanto à capacidade de formar micorrizas, visando a seleção de mutantes.

## ABSTRACT

COELHO, Irene da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2008. **Identification of genes expressed during the pre-symbiotic interaction in the *Hydnangium* sp.-*Eucalyptus grandis* ectomycorrhizal association and transformation of ectomycorrhizal fungi.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo, Co-Advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Maurício Dutra Costa.

Gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic interaction was evaluated using an *in vitro* mycorrhization technique aiming at constructing a suppressive subtractive cDNA library. The fungus was cultivated in the presence of *Eucalyptus grandis* roots, with no direct physical contact between both organisms. Genes that code for putative proteins involved in carbohydrate, amino acid, and energy metabolism, transcription and protein synthesis, cellular communication, signal transduction, stress defense, transposons, and proteins related to the biogenesis of cell components were identified. The expression of genes that code for pyruvate dehydrogenase, ATP synthase, a voltage-dependent ion-selective channel, acetyl-CoA acetyl transferase, and hydrophobin was evaluated by quantitative RT-PCR. The differential expression of these genes during the pre-symbiotic interaction confirmed the activation of genes related to beta-oxidation and mitochondrial metabolism, besides validating the suppressive subtractive library obtained. The construction of the subtractive library

of *Hydnangium* sp. will make possible the study of different genes related to mycorrhization, facilitating our understanding of the molecular mechanisms involved in the ectomycorrhizal association. For *Hydnangium* sp., transformation in the presence of PEG/CaCl<sub>2</sub> was necessary to optimize the conditions for the formation and regeneration of protoplasts. The highest production of protoplasts of *Hydnangium* sp., 1.06 x 10<sup>7</sup> protoplasts/mL, was obtained after two hours in KCl 0.6 M, in the presence of 20 mg/mL of "Lysing Enzymes" and 0.3 g of two-day old mycelium. For protoplast regeneration, the effects of different osmotic stabilizers, agar concentrations in MNM medium and length of incubation in the hydrolytic preparation were tested. So far, none of the conditions tested allowed the regeneration of *Hydnangium* sp. protoplasts. For the transformation of *Hydnangium* sp. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, several parameters were tested. No transformants were obtained and this was partly explained by the inhibitory effect of *Hydnangium* sp. on the agrobacteria tested. The transformation of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* mediated by *A. tumefaciens* was established with an efficiency 32.6%. The integration of the gene *hph* in the genome of the transformants was confirmed by the detection of a 690-pb DNA fragment with the expected size. For mutant selection, transformants with only one copy of T-DNA inserted in the genome will be tested for the capacity to form ectomycorrhizas.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Micorrizas são associações mutualistas entre fungos do solo e raízes de planta. Entre os cinco tipos de micorrizas existentes, as mais amplamente distribuídas são as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas (Brundrett, 2004).

As ectomicorrizas são caracterizadas pela formação do manto fúngico em torno da raiz, da rede de Hartig, formada pela penetração das hifas nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex, e uma rede de filamentos que interligam as micorrizas ao solo e aos corpos de frutificação (Smith & Read, 1997). Este tipo de micorriza ocorre em cerca de 8000 espécies vegetais e, no Brasil, muitas plantas arbóreas de importância econômica, usadas na produção de madeira, carvão e celulose, como *Pinus* sp., *Eucalyptus* sp. e *Acassia mangium*, são capazes de associar-se a esses fungos, resultando na formação de ectomicorrizas (Costa et al., 2003; Taylor & Alexander, 2005).

As ectomicorrizas promovem vários benefícios para as plantas, principalmente nas regiões onde fatores climáticos e edáficos são limitantes (Allen, 1992). O crescimento extra-radicular das hifas aumenta o volume de solo explorado pelo sistema radicular, proporcionando aumento da absorção de água e nutrientes do solo, por exemplo, o fósforo (Smith & Read, 1997). Além disso, as

plantas beneficiam-se pelo aumento da resistência a altas e baixas temperaturas, pela proteção contra patógenos de raiz e a metais pesados (Marx, 1969; Le Tacon et al., 1987; Marschner, 1992). Em contrapartida, o fungo beneficia-se, principalmente, pelo fornecimento de carbono orgânico pela planta (Smith & Read, 1997).

Estima-se que 7000 a 10000 espécies de fungos formam ectomicorrizas com angiospermas e gimnospermas, sendo que a maioria são homobasidiomicetos (95 %), alguns são ascomicetos (4,8 %) e poucos pertencem ao gênero *Endogone*, que são zigomicetos (Molina et al., 1992; Taylor & Alexander, 2005)

No Brasil, foram encontrados em associação com eucaliptos, fungos pertencentes aos gêneros *Amanita*, *Chondrogaster*, *Descomyces*, *Geastrum*, *Hydnangium*, *Hysterangium*, *Labyrinthomyces*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Setchelliogaster*, *Suillus* e *Telephora* (Coelho et al., 1997; Campos, 2004; Giachini et al., 2004).

O fungo *Hydnangium* sp., basidiomiceto pertencente à família Hydnangiaceae, foi encontrado na Austrália, Nova Zelândia, Portugal, Espanha e nos Estados Unidos (Malajczuk et al., 1982; Chu-chou & Grace, 1983; Zipcodezoo, 2008). Foram descritas 70 espécies e subespécies do gênero *Hydnangium* (Index Fungorum, 2008). A sua ocorrência no Brasil foi relatada pela primeira vez em 2004, em uma plantação comercial de *Eucalyptus grandis* em Minas Gerais (Campos, 2004). Há relatos da formação da associação ectomicorrízica com outras espécies de eucaliptos, tais como *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus marginata*, *Eucalyptus maculata* (Malajczuk et al., 1982), *Eucalyptus pilularis* (Moore et al., 1989), *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus diversicolor* (Bougher et al., 1993). Têm sido encontrado freqüentemente em plantações com idade de plantio mais avançada, em torno de oito anos, em florestas nativas (Chu-chou & Grace, 1983; Lu et al., 1999).

Este fungo forma basidiocarpo avermelhado que pode ser hipógeo ou sub-epígeo. Após o isolamento em meio de cultivo, foram observados grampos de conexão nas hifas e nos rizomorfos. As hifas apresentam crescimento vegetativo rápido *in vitro*, em relação a outros fungos, e são septadas com coloração hialina (Campos, 2004).

Na formação de ectomicorriza *in vitro* entre *E. grandis* e *Hydnangium* sp. ocorreu a formação de ectomicorrizas típicas e de basidiocarpos após 3 meses de inoculação. O fungo *Hydnangium* sp. forma ectomicorrizas de coloração creme, com ramificação simples ou raramente bifurcada nas laterais. As ectomicorrizas mais velhas apresentam coloração marrom no ápice. O micélio externo, de coloração hialina, também apresenta grampos de conexão. A superfície do manto é lisa, sendo formada de apenas uma fina camada, com a presença de grampos de conexão (Campos, 2004).

Na formação de ectomicorriza *in vitro* entre *E. pilularis* e *Hydnangium carneum*, a colonização das raízes laterais ocorreu 14 dias após a inoculação. Após 8 a 12 semanas, o sistema radicular formou cachos compactos de raízes laterais micorrízicas. Micorrizas laterais puderam ser detectadas em três ordens de raízes, observando-se denso manto branco e rede de Hartig. O manto foi formado de duas camadas distintas de hifas, uma mais externa e outra, interna. Na camada externa as hifas eram pequenas e uniformes e na camada interna, maiores e modificadas. Depósitos granulares de polifosfatos foram observados nas hifas do manto interno (Moore et al., 1989).

O fungo ectomicorrízico do gênero *Laccaria* é basidiomiceto pertencente à família Hydnangiaceae e 170 espécies já foram descritas (Index Fungorum, 2008). Foi encontrado nos Estados Unidos, Nova Zelândia, Portugal, Espanha, Austrália, Brasil, entre outros países (Giachini et al., 2004; Osmundson et al., 2005; Zipcodezoo, 2008). Coloniza gimnospermas, a exemplo do gênero *Pinus*, e angiospermas, como *Eucalyptus*. É observada em plantações de eucalipto a

predominância deste fungo em plantações mais novas, entre um e cinco anos (Massicotte et al., 1989; Lu et al., 1998). As ectomicorrizas de eucalipto formadas com esse fungo apresentam cor branca cremosa, bifurcação simples com denso manto (Lu et al., 1998).

Apesar de apresentarem crescimento vegetativo lento *in vitro*, algumas espécies de *Laccaria* possuem a habilidade de crescer vegetativamente a partir da germinação dos basidiósporos em meio de cultura, sendo este gênero utilizado como modelo experimental para estudos de ectomicorrizas (Molina, 1982; Kropp et al., 1986; Bills et al., 1990, Kim et al., 1998; Lei et al., 1991, Baum et al., 2002; Podila et al., 2002; Kemppainen et al., 2005, Jany et al., 2006, Heller et al., 2008).

O genoma de *Laccaria bicolor* foi seqüenciado e tem um tamanho de 65 Mb, sendo o maior genoma de fungo seqüenciado até o momento (Martin et al., 2008). Nenhuma evidência de duplicações em grande escala foi observada, somente muitos exemplos de pequenas regiões de duplicação em tandem de famílias multigênicas. Estimou-se o número de 20.614 genes, além de grande número de transposons e seqüências repetidas. Cerca de 88 % dos genes possuem éxons, com média de 5,4 éxons por gene. O tamanho médio do gene foi de 1,5 kb, com média de tamanho de transcrito de 1,1 kb. O tamanho médio das proteínas preditas foi de 367 aminoácidos. O tamanho dos éxons foi em torno de 210 nucleotídeos, enquanto para íntrons foi de 93 nucleotídeos. Possíveis repetições teloméricas foram identificadas a partir das seqüências repetitivas, estimando-se que esse fungo possua, no mínimo, 10 cromossomos.

A disponibilidade das seqüências do genoma de *L. bicolor* permitirá análises comparativas e ampliação do conhecimento do processo pelo qual o simbiote interage com plantas dentro do ecossistema, executando funções vitais no ciclo do carbono e do nitrogênio, que são fundamentais para sustentar a produtividade da planta (Martin et al., 2008).



Baseado em características morfológicas e moleculares, *Laccaria* e *Hydnangium* formam um clado monofilético. Espécies de *Laccaria* formam ectomicorrizas com grande diversidade de plantas, mas espécies individuais variam no grau de especificidade. Já as espécies de *Hydnangium* são restritas ao gênero *Eucalyptus*. Devido à ampla distribuição, *Laccaria* e *Hydnangium* representam modelos apropriados para estudos de diversidade, de biogeografia e de especificidade de hospedeiros (Mueller & Hosaka, 2006). Desta forma as informações disponíveis por meio do seqüenciamento do genoma de *Laccaria* poderão ser aplicadas para estudos do fungo *Hydnangium*.

Devido à importância dos fungos ectomicorrízicos para plantas de interesse florestal, é essencial que sejam identificados os fatores que regulam a atividade metabólica e o desenvolvimento simbiótico, ampliando o entendimento do papel das ectomicorrizas na fisiologia e desenvolvimento da planta, assim como seu significado ecológico (Martin et al., 2008).

A formação da ectomicorriza caracteriza-se pela sucessão regulada de modificações morfológicas durante a colonização da raiz pela hifa do fungo (Smith & Read, 1997; Martin et al., 1997; Tagu et al., 2002). Na fase de pré-infecção, que precede o contato entre a planta e o fungo, compostos produzidos pelos simbiossitos elicitam respostas fisiológicas e genéticas que levam à determinação da compatibilidade da simbiose. Após a fase de pré-infecção, a hifa alcança a superfície da raiz, tornando-se mais ramificada. As células fúngicas em contato com as células da raiz aumentam de tamanho e se aderem firmemente à raiz. A colonização da superfície radicular é acompanhada pela inibição de pêlos radiculares pré-existentes. A formação do manto induz importantes mudanças no material extra-matrical envolvendo o aparecimento de nova interface entre o fungo e a célula radicular. As hifas da rede de Hartig avançam para o interior do compartimento apoplástico da raiz. A parede celular e a membrana plasmática apresentam-se altamente invaginadas e as células tornam-se multinucleadas e

ricas em mitocôndrias e retículo endoplasmático, indicando a alta atividade metabólica.

A expressão de genes associados ao desenvolvimento de ectomicorrizas é induzida ou reprimida moderadamente, raramente excedendo o nível de cinco vezes em relação ao do controle, não tendo sido observado a indução da expressão de genes específicos da simbiose (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Polidori et al., 2002; Peter et al., 2003; Johansson et al., 2004; Menotta et al., 2004; Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008).

Para os sistemas, *Eucalyptus-Pisolithus* e *Betula-Paxillus*, foram realizados estudos do perfil de expressão gênica utilizando arranjos de cDNA (Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005). Após a síntese e marcação dos cDNAs provenientes de RNAs derivados de raízes e micélio em diferentes fases de formação da simbiose, estes foram utilizados na hibridização dos arranjos de cDNA, confirmando que as alterações na morfologia, que são associadas com o desenvolvimento da micorriza, foram acompanhados de mudanças no padrão de transcrição, desde o momento do contato entre o fungo e a planta, antes da formação da ectomicorriza funcional. Durante o desenvolvimento da simbiose, observa-se a indução de genes que codificam proteínas relacionadas à proliferação e divisão celular, sinalização e diferenciação, síntese da parede celular e matriz extracelular, respostas de defesa da planta ou a estresse e metabolismo primário, como glicólise, biossíntese de aminoácidos e atividade de transportadores.

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 fatores de transcrição e/ou vias de transdução pré-existentes, mais do que pela expressão de genes específicos da simbiose (Martin et al., 2007).

Na fase pré-simbiótica, que precede o contato físico entre a planta e o fungo, as hifas na rizosfera induzem intensa formação de raízes curtas, aumentando a área de contato com o hospedeiro. A base molecular dos processos envolvidos na pré-micorrização não é elucidada, mas sabe-se que o micobionte altera vias reguladas por auxina, a atividade meristemática e as mudanças celulares pela ação de moléculas secretadas, como hipaforinas, que são antagonistas ao ácido indolacético (Martin et al., 2001; Martin et al., 2007). A rutina, um composto fenólico encontrado nos exsudatos das raízes dos eucaliptos, pode ser sinal da simbiose ectomicorrízica, uma vez que estimula o crescimento das hifas de certas estirpes de *Pisolithus* em concentrações picomolares (Lagrange et al., 2001). Por outro lado, a hipaforina, derivada do triptofano, é secretada por *Pisolithus* e pode paralisar o alongamento dos pêlos radiculares e estimular a formação de raízes pequenas na planta hospedeira, possivelmente atuando como antagonista de auxina da planta (Ditengou & Lapeyrie, 2000; Ditengou et al., 2000; Martin et al., 2001; Kawano et al., 2001).

Nesta fase, uma série complexa de interações moleculares é ativada (Podila et al., 2002; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008). Na planta, é ativada a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na percepção e transmissão de sinais e respostas a estresse, metabolismo e crescimento (Krüger et al., 2004; Frettinger et al., 2007, Heller et al., 2008). No sistema *Quercus robur* e *Piloderma croceum*, foram identificados genes diferencialmente expressos na planta durante a fase pré-simbiótica da associação. Foram identificados quatorze cDNAs que codificam proteínas com similaridade significativa a outras proteínas de função conhecida, como por exemplo, proteínas envolvidas no processo de reconhecimento como inibidor de apoptose, proteína de interação rev e serina carboxipeptidase, percepção e transdução de sinal como feromônio de levedura, peptidil-prolil-isomerase e duas cinases, e aquelas envolvidas na resposta a estresse como

formato desidrogenase e metalotioneína. Foram identificados também cDNAs que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e crescimento, como as fosfoglicerato mutase, ribonuclease específica a poli(A), proteína ribossomal L17, proteína *like* ATPase transportadora de Ca<sup>2+</sup> e expansina (Krüger et al., 2004).

No fungo ocorre expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na síntese dos componentes e formação da parede celular, metabolismo fúngico e processo de destoxificação celular, sinalização celular, ciclo celular e dobramento e transporte de proteínas através da parede celular (Podila et al., 2002; Menotta et al., 2004; Zaretsky et al., 2006). Na identificação de genes diferencialmente expressos no fungo *L. laccata* na fase pré-simbiótica da associação com *Pinus resinosa*, cerca de 13 % dos cDNAs codificam proteínas com significativa similaridade a proteínas relacionadas a transdução de sinal como PF2.6, proteína ras, beta transducinas, proteínas cinases, receptores cinases, 15 % a metabolismo como acetil CoA oxidase, β-ceto tiolase, malato sintase, entre outros, 10 % a síntese e processamento de proteínas, 9 % a transporte e movimento de íons/peptídeos e aminoácidos, 7 % a proteínas estruturais, 5 % a processamento de RNA/DNA; 6 % a regulação transcricional e cerca de 10% a proteínas hipotéticas com funções não conhecidas (Podila et al., 2002).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a identificação de genes diferencialmente expressos, como *serial analysis of gene expression* (SAGE) (Velculescu et al., 1995), *differential display* (DD) (Liang & Pardee, 1992), *cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis* (cDNA-AFLP) (Vos et al., 1995; Bachem et al., 1996), os *microarrays* – microarranjos (Schena et al., 1995) e *suppressive subtractive hybridization* (SSH) – hibridização subtrativa supressiva (Diatchenko et al., 1996).

A técnica de SAGE baseia-se no princípio de que seqüências curtas de 9 pares de base são suficientes para identificar todos os RNAs mensageiros expressos. Assim, os cDNAs são gerados com oligo-dT biotinilados e clivados com

uma enzima de restrição que reconhece 4 pares de bases. Os fragmentos de DNA correspondentes à porção 3' final dos RNAs mensageiros são capturados por estreptavidina ligada a esferas, e seletivamente purificados. No sítio da enzima de restrição destas regiões é ligado um adaptador contendo um sítio para *BsmF1*, enzima que cliva 12 pares de bases a partir de sua seqüência de reconhecimento. Após a clivagem com esta enzima, cada fragmento de cDNA dá origem a um único *tag* (etiqueta) de 9 pares de bases. Os *tags* são ligados entre si e seqüenciados, gerando uma tabela de freqüência de cada *tag*. Comparando esta tabela entre as condições que se quer avaliar, os genes diferencialmente expressos são identificados (Velculescu et al., 1995). O SAGE permite a análise de muitas amostras ao mesmo tempo, porém análises estatisticamente significativas podem ser dispendiosas, devido à grande demanda de seqüenciamento, requer banco de dados de referência e *tags* menores podem mostrar redundância no banco de dados (Donson et al., 2002).

A técnica de *differential display* baseia-se na amplificação de uma população de cDNAs, utilizando oligonucleotídeos arbitrários. Os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese, comparando as condições experimentais, e, os fragmentos de DNA diferenciais são eluídos do gel e identificados por seqüenciamento (Liang & Pardee, 1992). Esta técnica é de baixo custo, entretanto, apresenta alta taxa de falsos positivos, problemas na reproducibilidade e sensibilidade, além do extensivo trabalho com eluições de fragmentos do gel e seqüenciamentos (Donson et al., 2002).

Para superar os problemas associados com o *differential display*, foi desenvolvida a técnica de cDNA-AFLP, onde o cDNA é clivado por duas enzimas de restrição, por exemplo, *MseI* e *TaqI*, e ligado a adaptadores específicos ao dois sítios de restrição. Os fragmentos são pré-amplificados com oligonucleotídeos específicos a seqüência dos dois adaptadores, mas com uma única extensão de nucleotídeos para evitar pareamento errado no estágio de amplificação seletiva. Na

amplificação seletiva, utiliza-se oligonucleotídeos específicos aos adaptadores com extensão de nucleotídeo na extremidade 3', 2 nucleotídeos para o oligonucleotídeo *TaqI* e 3 nucleotídeos para o oligonucleotídeo *MseI*, sendo que o oligonucleotídeo *TaqI* é marcado com  $^{33}\text{P}$  na sua extremidade. A próxima etapa é a visualização dos fragmentos de DNA amplificados com os oligonucleotídeos *TaqI* e *MseI* em um gel de poliacrilamida (Vos et al., 1995; Bachem et al., 1996). O cDNA-AFLP também apresenta baixo custo, além de superar os problemas que ocorrem no *differential display* com a utilização de oligonucleotídeos específicos, porém também demanda bastante trabalho nas eluições de fragmentos do gel e seqüenciamentos (Donson et al., 2002).

Na técnica de microarranjos de DNA, seqüências conhecidas de cDNA são organizadas sobre lâminas de vidro ou membranas de *nylon*. Durante a síntese do cDNA, o RNA total ou RNA mensageiro de duas diferentes amostras é marcado com nucleotídeos fluorescentes, como por exemplo, Cy3 ou Cy5. Os cDNAs marcados são misturados e hibridizados no microarranjo. Após o período de hibridização, a quantidade de cDNA fluorescente em cada um dos *spots* é medida por um *scanner* de fluorescência, por meio de exposições seqüenciais utilizando comprimentos de luz específicos aos dois corantes Cy. Emissões espectrais específicas destes corantes são capturadas por sensores confocais, as intensidades de emissões são extraídas e por meio de programas específicos são gerados dados que possibilitam a determinação do nível de expressão dos genes (Schena et al., 1995). Dentre as vantagens dos microarranjos podemos destacar a flexibilidade na definição da extensão do genoma a ser analisado, as duas amostras de cDNA são hibridizadas em paralelo porém pode ocorrer problemas de hibridização cruzada, além de serem relativamente caros (Donson et al., 2002).

A hibridização subtrativa supressiva é baseada na amplificação, pela reação de polimerase em cadeia (PCR), de seqüências diferencialmente representadas em duas populações de mRNAs e a supressão da amplificação das seqüências

comuns (Diatchenko et al., 1996). Nas metodologias de hibridização subtrativa, as amostras de cDNA contendo os genes diferencialmente expressos que se quer identificar, são ligadas a adaptadores em sua porção 5', desnaturadas e renaturadas na presença de excesso de cDNA da condição controle. Na etapa seguinte, os fragmentos hibridizados diferencialmente expressos contendo adaptadores nas duas extremidades são seletivamente amplificados por PCR. Os cDNAs obtidos são clonados, gerando uma biblioteca enriquecida de genes diferencialmente expressos.

Entre as vantagens da hibridização subtrativa supressiva está o custo relativamente baixo, possibilidade de identificação de novos genes e enriquecimento da biblioteca com genes pouco expressos (Diatchenko et al., 1996). Vários genes que são diferencialmente expressos durante o estabelecimento da simbiose ectomicorrízica têm sido identificados pela técnica de hibridização subtrativa supressiva (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004).

Genes relacionados à simbiose têm sido identificados por meio de bancos de dados de genomas seqüenciados ou de etiquetas de seqüências expressas (*ESTs - expressed sequence tags*) e análises de expressão diferencial (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Polidori et al., 2002; Peter et al., 2003; Johansson et al., 2004; Menotta et al., 2004; Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Martin et al., 2008). No entanto, a comprovação que estes genes regulados pela simbiose são essenciais para formação e diferenciação da micorriza é ainda necessária (Martin et al., 2008).

Desta forma, a mutagênese insercional pode ser uma estratégia para o isolamento e identificação de genes essenciais para a formação da micorriza. A técnica de transformação foi utilizada para mutagênese insercional aleatória visando a obtenção de mutantes do basidiomiceto ectomicorrízico *Hebeloma cylindrosporum* incapazes de formarem micorrizas. Observações de microscopia

de luz e eletrônica das raízes de pinus inoculadas com mutantes não micorrízicos (*myc null*) sugerem que estes mutantes foram bloqueados nos estágios iniciais da interação (Combier et al., 2004). Porém, tais técnicas não têm sido usadas para alguns fungos, principalmente devido às dificuldades no estabelecimento de protocolos eficientes de transformação.

Diferentes técnicas têm sido empregadas na transformação de fungos como, por exemplo, tratamento com o LiCl (Binninger et al., 1987; Dantas-Barbosa et al., 1998), eletroporação (Richey et al., 1989; Marchand et al., 2007; Kuo & Huang, 2008), biobalística (Lorito et al., 1993; Sunagawa & Magae, 2002; Sunagawa et al., 2007), transformação por PEG/CaCl<sub>2</sub> (Tilburn et al., 1983; Kuo & Huang, 2008) e por *Agrobacterium tumefaciens* (Bundock et al., 1995; Karunakaran et al., 2008).

O sistema de transformação por PEG/CaCl<sub>2</sub> tem sido utilizado para transformação de muitos fungos filamentosos, como por exemplo, *Aspergillus* (Yelton et al., 1984; Ballance & Turner, 1985), *L. laccata* (Barrett et al., 1989), *Trichoderma* (Herrera-Estrella et al., 1990), *Penicillium* (Durand et al., 1992; Dias et al., 1997; Varavallo et al., 2005), *H. cylindrosporum* (Marmeisse et al., 1992), *Agaricus bisporus* (Van der Rhee et al., 1996), *Verticillium fungicola* (Amey et al., 2002), *Crinipellis perniciosus* (Lima et al., 2003), *Venturia inaequalis* (Fitzgerald et al., 2003) e *Pleurotus nebrodensis* (Lin et al., 2008). Entretanto, a eficiência de transformação por PEG/CaCl<sub>2</sub> é relativamente baixa e restrita a algumas espécies. Outra desvantagem desta técnica é a dependência de um sistema eficiente de obtenção e regeneração de protoplastos (Fincham, 1989; Ruiz-Diez, 2002).

Protoplastos são importantes ferramentas para a determinação do número e tamanho de cromossomos de diferentes espécies, bem como a localização de genes nestes cromossomos, por eletroforese em campo pulsado (Peberdy, 1991; Tahoun, 1993; Boss, 1996; Azevedo, 1998; Larraya et al., 1999). Vários fatores devem ser considerados para a obtenção de protoplastos de fungos, como a idade



do micélio, o meio de cultivo, o estabilizador osmótico e a preparação hidrolítica (Peberdy et al., 1976).

Deve-se assegurar, também, a regeneração de protoplastos, que consiste da reconstituição da parede celular e retorno à forma micelial. A frequência de regeneração obtida com diferentes fungos varia de 0,1 a 50 %, dependendo, principalmente, da espécie fúngica, da ploidia da célula, do tempo de digestão da preparação hidrolítica e do meio de regeneração (Peberdy, 1979; Stasz et al., 1988). O micélio de *Suillus granulatus* foi cultivado no meio com diferentes estabilizadores, e dentre eles, observou-se maior crescimento micelial do fungo quando sacarose, KCl e MgSO<sub>4</sub> foram utilizados, indicando que eles poderiam ser utilizados para regeneração de protoplastos de *Suillus*, ou seja, estes estabilizadores, além de fornecerem estabilidade osmótica aos protoplastos, não estariam causando outras alterações no metabolismo celular (Dias, 1992).

Alguns protocolos para obtenção e regeneração de protoplastos já foram estabelecidos para diferentes espécies de basidiomicetos, como *Rhizoctonia solani* (Hashiba & Yamada, 1982), *P. tinctorius* (Anunciação et al., 1990); *S. granulatus* (Dias et al., 1996), *Pseudozyma flocculosa* (Cheng & Belanger, 2000), *Lentinus lepideus* (Kim et al., 2000), *C. perniciosus* (Santos, 2001), *Epulorhiza repens* e *Ceratorhiza* sp. (Coelho et al., 2008). Porém, para algumas espécies há grande dificuldade na obtenção dos protoplastos devido à presença de estruturas complexas na parede celular, como por exemplo, a grande quantidade de pigmentos e sensibilidade à fragmentação, como o que ocorre em *Pisolithus* sp. (Anunciação et al., 1990; Rodrigues et al., 1999; Abreu, 2001), além da dificuldade na regeneração desses protoplastos, que pode ser devido ao grande número de protoplastos anucleados, uma vez que há somente dois núcleos por compartimento de hifa, como, em *Pisolithus* sp. e *C. perniciosus* (Abreu, 2001; Santos, 2001).

Devido às limitações para obtenção e regeneração de protoplastos, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado como

método alternativo. A técnica de transformação mediada *por A. tumefaciens* é baseada na habilidade desta bactéria em transferir T-DNA para células eucarióticas (Binns & Thomashow, 1988). *Agrobacterium tumefaciens* é o agente causal da galha-da-coroa, doença que afeta a maioria das plantas dicotiledôneas e caracteriza-se pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz. A formação desses tumores é o resultado de um processo natural de transferência de genes da *Agrobacterium* sp. para o genoma da planta infectada (Nester et al., 1984; Binns & Thomashow, 1988). Esta bactéria possui um plasmídeo com tamanho na faixa de 120 a 250 kb denominado plasmídeo Ti (*tumor inducing*), que é constituído por duas regiões: o T-DNA, que contém a porção de DNA que será transferida na forma de fita simples, tem suas extremidades, esquerda e direita, delimitadas por 25 pares de bases com repetições diretas imperfeitas, sendo que qualquer seqüência de bases que for inserida entre essas duas extremidades, será integralmente transferida para a planta, independente de seu tamanho, e inserida, aleatoriamente, no seu genoma; e a região de virulência (região *vir*), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA (Stachel & Nester, 1986).

Este sistema de transferência tem sido adaptado para possibilitar a transferência de DNA *in vitro* para vários organismos, tais como leveduras (Bundock et al., 1995; Bundock et al., 2002), e fungos filamentosos (De Groot et al., 1998; Abuodeh et al., 2000; Meyer et al., 2003; Reis et al., 2004; Michielse et al., 2005a, Duarte et al., 2007; Gorfer et al., 2007; Marchand et al., 2007; Maruthachalam et al., 2008). Dentre os fungos filamentosos, vários basidiomicetos tiveram o sistema de transformação mediada *por A. tumefaciens* estabelecido, como: *A. bisporus* (Chen et al., 2000; Mikosch et al., 2001); *H. cylindrosporum*, *Paxillus involutus* (Pardo et al., 2002; Müller et al., 2006); *L. bicolor* (Kemppainen et al., 2005); *P. tinctorius* (Rodríguez-Tovar et al., 2005); *P. microcarpus* (Pardo et al.,

2005); *S. bovinus* (Hanif et al., 2002); *S. grevillei* (Murata et al., 2006b) e *Tricholoma matsutake* (Murata et al., 2006a).

Alguns estudos relacionados com a transferência do T-DNA da agrobactéria para o genoma dos fungos têm sido realizados e mostraram que a integração no genoma ocorre com frequência similar àquela que ocorre com as plantas (Michielse et al., 2003). A utilização de acetoseringona nos experimentos de transformação também apresentou uma grande importância, pois ativam os genes *vir* e sua ausência pode não resultar transformantes (Sun et al., 2002). Sabe-se também que a inativação da proteína VirE2 pode deixar o T-DNA mais vulnerável à degradação por enzimas do núcleo, resultando em baixa quantidade de transformantes, como observado na transformação de *Aspergillus awamori* (Michielse et al., 2003).

Uma das principais vantagens da transformação mediada por *Agrobacterium* é que esta pode ser realizada a partir de esporos, micélio, corpos de frutificação e protoplastos (Michielse et al., 2005b). Outra vantagem é a possibilidade de recuperação das seqüências interrompidas. Duas metodologias são bastante utilizadas para identificar essas seqüências, como TAIL-PCR - *thermal asymmetric interlaced-polymerase chain reaction* (Liu et al., 1995; Liu & Whittier, 1995) e *plasmid rescue* – recuperação do plasmídeo (Kemppainen et al. 2008).

A técnica de TAIL-PCR tem sido utilizada em plantas e fungos, mas sua limitação é a dependência da conservação das extremidades do T-DNA. Após a integração do T-DNA no genoma do hospedeiro as seqüências da extremidade esquerda e direita são somente parcialmente conservadas e este fato pode impedir a amplificação de muitos produtos de PCR em que as extremidades tiveram variações nas seqüências após a integração (Meng et al., 2007). Este método foi utilizado para recuperar seqüências interrompidas no fungo ectomicorrízico *H. cylindrosporum*, onde dos 15 transformantes analisados, somente duas seqüências genômicas que flanqueavam a borda direita puderam ser amplificadas (Combiér et al. 2003).

No método de recuperação de plasmídeo, as junções T-DNA e DNA genômico são recuperadas via replicação do plasmídeo de *Escherichia coli*. Para isso é necessário a presença de marcas de seleção bacterianas e origem de replicação no T-DNA utilizado para transformação do fungo. O DNA genômico dos transformantes é clivado e ligado gerando plasmídeos que contêm sítios de integração no genoma hospedeiro que serão seqüenciados com oligonucleotídeos específicos que anelam no T-DNA. As seqüências genômicas são diretamente mantidas nos plasmídeos recuperados e as informações obtidas não são estritamente dependentes do grau de conservação das extremidades do T-DNA (Kemppainen et al., 2008). A técnica de recuperação do plasmídeo foi utilizada para identificar diferentes genes interrompidos no genoma dos mutantes obtidos do fungo *L. bicolor* (Kemppainen et al., 2008).

O desenvolvimento de vetores baseados no sistema de transformação mediada por *A. tumefaciens* requer a conservação das extremidades direita e esquerda de 25 pb, que são necessárias para a transferência do T-DNA, e da região *vir* (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Para transformação de plantas e fungos, têm sido utilizados vetores binários, onde o T-DNA e a região de virulência são inseridos em dois plasmídeos separados, que permite a manipulação genética do T-DNA contido no vetor binário (Hoekema et al., 1983).

A transformação mediada por *A. tumefaciens* de fungos filamentosos é uma técnica promissora para ser utilizada na análise funcional de genes em fungos, e isso, faz deste sistema uma ferramenta para o desenvolvimento da genômica funcional em fungos ectomicorrízicos.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.M. Obtenção de protoplastos de fungos ectomicorrízicos e análise da diversidade genética de *Penicillium* spp. 64p. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- ABUODEH, R.O.; ORBACH, M.J.; MANDEL, M.A.; DAS, A.; GALGIANI, J.N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Infectious Diseases*. 181:2106-2110, 2000.
- ALLEN, M.F.A. *The ecology of mycorrhizae*. Ed. Cambridge. Cambridge University Press, 1992. 184p.
- AMEY, R.C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P.R.; BAILEY, A.; FOSTER, G.D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycological Research*. 106:4-11, 2002.
- ANUNCIÇÃO, C.E.; GUIMARÃES, W.V.; ARAÚJO, E.F.; MUCHOVEJ, R.M.; SOUZA, D.R.N. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. *Biotechnology Techniques*. 4:215-220, 1990.
- AZEVEDO, J.L. *Genética de Microrganismos*. Ed. UFG, Goiânia, Goiás, 1998. 478p.
- BACHEM, C.W.B.; VAN DER HOEVEN, R.S.; DE BRUIJIN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G.F. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during *Tuber* development. *Plant Journal*. 9:745-753, 1996.
- BALLANCE, D.J.; TURNER, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 36:321-331, 1985.
- BARRETT, V.; LEMKE, P.A.; DIXON, R.K. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30:381-387, 1989.
- BAUM, C.; STETTER, U.; MAKESCHIN, F. Growth response of *Populus trichocarpa* to inoculation by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in a pot and a field experiment. *Forest Ecology and Management*. 163:1-8, 2002.

- BILLS, S.; PODILA, G.; HIREMATH, S. Genetic engineering of a fungus *Laccaria bicolor* for use as a biological control agent. *Mycologia*. 9:237-242, 1990.
- BINNINGER, D.M.; SKRZY尼亚, C.; PUKKILA, P.J.; CASSELTON, L.A. DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO Journal*. 6:835-40, 1987.
- BINNS, A.N.; THOMASHOW, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology*. 42:575-606, 1988.
- BOSS, C.J. Fungal genetics. New York, Marcel Dekker, 1996. 442p.
- BOUGHER, N.L.; TOMMERUP, I.C.; MALAJCZUK, N. Broad variation in developmental and mature basidiome morphology of the ectomycorrhizal fungus *Hydnangium sublamellatum* sp. nov. bridges morphologically based generic concepts of *Hydnangium*, *Podohydangium* and *Laccaria*. *Mycological Research*. 97:613-619, 1993.
- BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological reviews*. 79:473-495, 2004.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*. 14:3206-3214, 1995.
- BUNDOCK, P.; VAN ATIJKUM, H.; DEN DULK-RAS, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast*. 19:529-536, 2002.
- CAMPOS, D.T.S. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto. 82p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C.; ROMAINE, C.P.A. Fruting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*. 66:4510-4513, 2000.
- CHENG, Y.; BELÁNGER, R.R. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 190:287-291, 2000.
- CHU-CHOU, M.; GRACE, L.J. Hypogeous fungi associated with some forest trees in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 21:183-190, 1983.
- COELHO I.S.; QUEIROZ, M.V.; COSTA, M.D.; KASUYA, M.C.M.; ARAÚJO, E.F. Production and regeneration of protoplasts from orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza repens* and *Ceratorhiza* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2008. Aceito para publicação.
- COELHO, F.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F.; MUCHOVEJ, R. M.C. 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, 1997.

- COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS Microbiology Letters. 220:141-148, 2003.
- COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; PÉPIN, R.; MARMEISSE, R.; GAY, G. Nonmycorrhizal (Myc(-)) mutants of *Hebeloma cylindrosporum* obtained through insertional mutagenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions. 17:1029-1038, 2004.
- COSTA, M.D.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. Ectomicorrizas: a face oculta das florestas – aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 29:38-46, 2003.
- DANTAS-BARBOSA, C.; ARAÚJO, E.F.; MORAES, L.M.; VAINSTEIN, M.H.; AZEVEDO, M.O. Genetic transformation of germinated conidia of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. FEMS Microbiology Letters. 169:185-190, 1998
- DE GROOT, M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology. 16:817-842, 1998.
- DIAS, E.S. Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo ectomicorrízico *Suillus granulatus* (Fr. Kuntze). 46p. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.
- DIAS, E.S.; ARAÚJO, E.F.; GUIMARÃES, W.V.; COELHO, J.I.; SILVA, D.O. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. Revista de Microbiologia. 28:116-120, 1997.
- DIAS, E.S.; ARAÚJO, E.F.; GUIMARÃES, W.V.; MUCHOVEJ, R.M.C. Production and regeneration of protoplast the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. World Journal Microbiology Biotechnology. 12:625-628, 1996.
- DIATCHENKO L.; LAU Y.F.; CAMPBELL A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 93:6025–6030, 1996.
- DITENGOU, F.A.; BÉGUIRISTAIN, T.; LAPEYRIE, F. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. Planta. 211:722-728, 2000.
- DITENGOU, F.A.; LAPEYRIE, F. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13:151-158, 2000.
- DONSON, J.; FANG, Y.; ESPIRITU-SANTO, G.; XING, W.; SALAZAR, A.; MIYAMOTO, S.; ARMENDAREZ, V.; VOLKMUTH, W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. Plant Molecular Biology. 48:75-97, 2002.

- DUARTE, R.T.D.; STAATS C.C.; FUNGARO M.H.P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, W.; FURLANETO, M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Letters in Applied Microbiology*. 44:248-254, 2007.
- DUPLESSIS, S.; COURTY P.E.; TAGU D.; MARTIN F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 165:599-611, 2005.
- DURAND, N.; REYMOND, P.E.; FEVRE, M. Transmission and modification of transformation markers during induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. *Current Genetics*. 21:377-383, 1992.
- FINCHAM,, J.R. Transformation in fungi. *Microbiology and Molecular Biology*. 53:148-170, 1989.
- FITZGERALD A.M.; MUDGE A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research*. 107:803-810, 2003.
- FRETTINGER, P.; DERORY, J.; HERRMANN, S.; PLOMION, C.; LAPEYRIE, F.; OELMÜLLER, R.; MARTIN, F.; BUSCOT, F. Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. *Planta*. 225:331-340, 2007.
- GIACHINI, A.J.; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza*. 14:375-381, 2004.
- GORFER, M.; KLAUBAU, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. *Mycological Research*. 111:850-855, 2007.
- HANIF, M.; PARDO, A.G.; GOLFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics*. 4:183-188, 2002.
- HASHIBA, T.; YAMADA, M. Formation and purification of protoplast from *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 72:849-853, 1982.
- HELLER, G.; ADOMAS, A.; LI, G.; OSBORNE, J.; VAN ZYL, L.; SEDEROFF, R.; FINLAY, R.D.; STENLID, J.; ASIEGBU, F.O. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biology*. 8:19-32, 2008.
- HERRERA-ESTRELLA, A.; GOLDMAN, G.H.; VAN MONTAGU, M. High-efficient transformation sytem for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology*. 4:839-843, 1990.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303:179-180, 1983.



HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*. 19:15-38, 1992.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em 12 de setembro de 2008.

JANY, J.L.; BOUSQUET, J.; GAGNÉ, A.; KHASA, D.P. Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. *Mycological Research*. 110:51–59, 2006.

JOHANSSON, T.; LE QUÉRÉ, A.; AHREN, D.; SÖDERSTRÖM, B.; ERLANDSSON, R.; LUNDEBERG, J.; UHLÉN, M.; TUNLID, A. Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:202-215, 2004.

KARUNAKARAN, M.; VIJAYAN, N.; HEE-SOOL, R.; JAEHYUK, C.; SOONOK, K.; YONG-HWAN, L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:234-241, 2008.

KAWANO, T.; KAWANO, N.; LAPEYRIE, F. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288:546-551, 2001.

KEMPPAINEN, M.; CIRCOSTA, A.; TAGU, D.; MARTIN, F.; PARDO, A.G. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza*. 16:19-22, 2005.

KEMPPAINEN, M.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; PARDO, A. T-DNA insertion, plasmid rescue and integration analysis in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology*. 1:258-269, 2008.

KIM, B.K.; KANG, J.H.; KIM, H.W.; SHIM, M.J.; CHOI, E.C. Mycelial protoplasts isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. *Life Science*. 66:1359-1367, 2000.

KIM, S.J.; HIREMATH, S.T.; PODILA, G.K. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*. 103:168-172, 1998.

KROPP, B.R.; MCAFEE, B.J.; FORTIN, J.A. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany*. 65:500-504, 1986.

KRÜGER, A.; PESKAN-BERGHÖFER, T.; FRETTEINGER, P.; HERRMANN, S.; BUSCOT, F.; OELMÜLLER, R. Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. *New Phytologist*. 163:149-157, 2004.

KUO, C.Y.; HUANG, C.T. A reliable transformation method and heterologous expression of beta-glucuronidase in *Lentinula edodes*. *Journal of Microbiological Methods*. 72:111-115, 2008.

- LAGRANGE, H.; JAY-ALLEMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*. 149:349-355, 2001.
- LARRAYA, L.; PEREZ, G.; PENAS, M.M.; BAARS, J.J.P.; MICOSCH, T.S.P.; PISABARRO, A.G.; RAMÍREZ, L. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:3413-3417, 1999.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:659-673, 2005.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. *Symbiosis*. 3:179-206, 1987.
- LEI, J.Y.; WONG, K.K.Y.; PICHÉ, Y. Extracellular concanavalin A-binding sites during early interactions between *Pinus banksiana* and two closely related genotypes of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*. 95:357-363, 1991.
- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257:967-971, 1992.
- LIMA, J.O.; SANTOS, J.K.; PEREIRA, J.F.; RESENDE, M.L.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetics*. 42:236-240, 2003.
- LIN, J.; ZHENG, M.; WANG, J.; SHU, W.; GUO, L. Efficient transformation and expression of *gfp* gene in the edible mushroom *Pleurotus nebrodensis*. *Progress in Natural Science*, 18:819-824, 2008.
- LIU, Y.G.; MITSUKAWA, L.N.; OOSUMI, T.; WHITTIER, R.F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*. 8:457-463, 1995.
- LIU, Y.G.; WHITTIER, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*. 25:674-681, 1995.
- LORITO, M.; HAYES, C.K.; PIETRO A.D.; HARMAN, G.E. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current Genetics*. 25:329-356, 1993.
- LU, X.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 8:81-86, 1998.
- LU, X.; MALAJCZUK, N.; MARK, B.; DELL, B. Fruiting of putative ectomycorrhizal fungi under blue gum (*Eucalyptus globulus*) plantations of different ages in Western Australia. *Mycorrhiza*. 8:255-261, 1999.

- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*: pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*. 91:467-482, 1982.
- MARCHAND, G.; FORTIER, E.; NEVEU, B.; BOLDUC, S.; BELZILE, F.; BÉLANGER R.R. Alternative methods for genetic transformation of *Pseudozyma antarctica*, a basidiomycetous yeast-like fungus. *Journal of Microbiological Methods*. 70:519-527, 2007.
- MARSCHNER, H. Nutrient dynamics at the soil-root interface (Rhizosphere). In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J (Ed) *Mycorrhizas in Ecosystems*, C.A.B International, 1992. pp.3-12.
- MARMEISSE, R.; DEBAUND, J.C.; CASSELTON, L.A. DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycology Research*. 96:161-165, 1992.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRÉN, D.; BRUN, A.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUÉE, M.; BROKSTEIN, P.; CANBÄCK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.; DANCHIN, E.G.J.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUCIC, E.; FREY-KLETT, P.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GÉRARD, J.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBÉ, J.; LIN, Y. C.; LEGUÉ, V.; LETACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; NICULITA-HIRZEL, H.; OUDOT-LESECQ, M.P.; PETER, G.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KÜES, U.; LUCAS, S.; VAN DE PEER, Y.; PODILA, G.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.; ROUZÉ, P.; SANDERS, I.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 452:88-92, 2008.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*. 151:145-154, 2001.
- MARTIN, F.; KOHLER, A.; DUPLESSIS, S. Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:204-210, 2007.
- MARTIN, F.; LAPEYRIE, F.; TAGU, D. Altered gene expression during ectomycorrhiza development in mycota. In: LEMKE, P.; CAROLL, G. *Plant relationships*. Berlin: Springer-Verlag. 1997. pp.223-242.
- MARUTHACHALAM, K.; NAIR, V.; RHO, H.S.; CHOI, J.; KIM, S.; LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:234-241, 2008.
- MARX, D.H. The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59:153-163, 1969.
- MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; MELVILLE, L.H. Hartig net structure of ectomycorrhizae synthesized between *Laccaria bicolor* (Tricholomataceae) and

- two hosts: *Betula alleghaniensis* (Betulaceae) and *Pinus resinosa* (Pinaceae). American Journal of Botany. 76:1654-1667, 1989.
- MENG, Y.; PATEL, G.; HEIST, M.; BETTS, M.; TUCKER, S.L.; GALADIMA, N.; DONOFRIO, N.M.; BROWN, D.; MITCHELL, T.K.; LI, L.; XU, J.; ORBACH, M.; THON, M.; DEAN, R.; FARMAN, A.M.L. A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genetic and Biology. 44:1050-1064, 2007.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vitad. and *Tilia americana* L. Current Genetics. 46:158-165, 2004.
- MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. Current Genetics. 43:371-377, 2003.
- MICHIELSE, C.B.; ARENTSHORST, M.; RAM, A.F.J.; VAN DER HONDEL, C.A.M.J.J. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. Current Genetics. 42:9-19, 2005a.
- MICHIELSE, C.B.; HOOVKAAS, P.J.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; RAM, A.F.J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetics. 48:1-17, 2005b.
- MICHIELSE, C.B.; RAM, A.F.J.; HOOYKAAS, P.J.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full-length VirD2, VirC2, or VirE2 leads to insertion of aberrant T-DNA structures. Journal de Bacteriology. 186:2038-2045, 2003.
- MIKOSCH, T.S.; LAVRIJSEN, B.; SONNENBERG, A.S.; VAN GRIENSVEN, L.J. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. Current Genetics. 39:35-39, 2001.
- MOLINA, R. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. I. Consistency between isolates in effective colonization of containerized conifer seedlings. Canadian Journal of Forest Research. 12:469-473, 1982.
- MOLINA, R.; MASSICOTTE, H.; TRAPPE, J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M.F. Mycorrhizal functioning – an integrated plant – fungal process. New York, Chapman and Hall, 1992. pp.357-423.
- MOORE, A.E.P.; MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L. Ectomycorrhiza formation between *Eucalyptus pilularis* Sm. and *Hydnangium carneum* Wallr. in Dietr. New Phytologist. 112:193-204, 1989.
- MUELLER, G.M.; HOSAKA, K. Biogeography and host preference of austral members of *Laccaria - Hydnangium*, a model clade of ectomycorrhizal fungi. 8th International Mycological Congress. 21-25 August, 2006. Cairns Convention Centre Queensland, Australia.
- MÜLLER, T.; BENJDIA, M.; AVOLIO, M.; VOIGT, B.; MENZEL, D.; PARDO, A.; FROMMER, W.B.; WIPF, D. Functional expression of the green fluorescent

- protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza*. 16:437-442, 2006.
- MURATA, H.; IGASAKI, T.; SHISHIDO, K.; SUNAGAWA, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* that produces commercially valuable fruit bodies, matsutake. *Mycoscience*. 47:228-231, 2006a.
- MURATA, H.; SUNAGAWA, M.; YAMAZAKI, T.; SHISHIDO, K.; IGASAKI, T. Expression of the autofluorescent protein, DsRed2, in the recombinants of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus grevillei*, generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mycorrhiza*. 16:407-412, 2006b.
- NESTER, E.W.; GORDON M.P.; AMASINO R.M.; YANOFSKY M.F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology*. 35:387-413, 1984.
- OSMUNDSON, T.W.; CRIPPS, C.L.; MUELLER, G.M. Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*. 97:949-972, 2005.
- PARDO, A.G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI, M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycology Research*. 106:132-137, 2002.
- PARDO, A.G.; KEMPPAINEN, M.; VALDEMOROS, D.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; TAGU, D. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Revista Argentina de Microbiologia*. 37:69-72, 2005.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L.L. *More gene manipulations in fungi*. New York, Academic Press, 1991. pp.307-318.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*. 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTREY, D.C.; MOORE, P.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transaction of the British Mycological Society*. 67:23-26, 1976.
- PETER, M.; COURTY, P.E.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; MARTIN, F. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 159:117-129, 2003.
- PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J.; HYMES, M. Molecular interactions in ectomycorrhizas: identification of fungal genes involved in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. *Plant and Soil*. 244:117-128, 2002.
- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. *Molecular Genetics and Genomics*. 266:858-864, 2002.

- REIS, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; FURNALETO, M.C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Microbiological Methods*. 58:197-202, 2004.
- RICHEY, M.G.; MAREK, E.T.; SCHARDL, C.L.; SMITH, D.A. Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. *Phytopathology*. 79:844-847, 1989.
- RODRIGUES, L.S.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza*. 8:263-266, 1999.
- RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B.E.; HIDALGO-LARA, M.E.; REYES-MÁRQUEZ, B.E.; CABRERA-PONCE, J.L.; VALDÉS, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tintorius*. *Journal of Microbiological Methods*. 63:45-54, 2005.
- RUIZ-DIEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 92:189-195, 2002.
- SANTOS, J.K. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-cacau no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270:467-470, 1995.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academy Press, 1997. 605p.
- STACHEL, S.E.; NESTER, E.W. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO Journal*. 5:1445-1454, 1986.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Protoplasts preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia*. 80:141-150, 1988.
- SUN, C.B.; KONG, Q.L.; XU, W.S. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 5, 2002.
- SUNAGAWA, M.; MURATA, H.; MIYAZAKI, Y.; NAKAMURA, M. Transformation of the mycorrhizal basidiomycetes, *Suillus grevillei* and *S. bovinus*, by particle bombardment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71:47-50, 2007.
- SUNAGAWA, M.; MAGAE, Y. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. *FEMS Microbiology Letters*. 211:143-146, 2002.
- TAGU, D.; LAPEYRIE, F.; MARTIN, F. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*. 244:97-105, 2002.

- TAHOUN, M.K. Gene manipulation by protoplast fusion and penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 39:445-453, 1993.
- TAYLOR, A.; ALEXANDER, I. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist. 19:102-112, 2005.
- TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G.G.; ZABICKY-ZISSMAN, J.H.; LOCKINGTON, R.A.; DAVIES, R.W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene. 26:205-221, 1983.
- VAN DER RHEE, M.D.; GRACA, P.M.A.; HUIZING, H.J.; MOOIBROEK, H. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. Molecular Genetics and Genomics. 250:252-258, 1996.
- VARAVALLO, M.A.; QUEIROZ, M.V.; PEREIRA, J.F.; RIBEIRO, R.A.; SOARES, M.A.; RIBEIRO, J.B.; ARAÚJO, E.F. Development of a transformation system for *Penicillium brevicompactum* based on the *Fusarium oxysporum* nitrate reductase gene. Brazilian Journal of Microbiology. 36:184-189, 2005.
- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. Science. 270:484-487, 1995.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. Plant Journal. 25:181-191, 2001.
- VOS, M.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23:4407-4414, 1995.
- YELTON, M.M.; HAMER, J.E.; TIMBERLAKE, W.E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. Proceeding National Academy Science USA. 81:1470-1474, 1984.
- ZARETSKY, M.; SITRIT, Y.; MILLS, D.; ROTH-BEJERANO, N.; KAGAN-ZUR, V. 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, 2006.
- ZIPCODEZOO. Disponível em: <http://zipcodezoo.com/>. Acesso em 10 de setembro de 2008.

## **CAPÍTULO 1**

**Expressão diferencial de genes do fungo *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica com *Eucalyptus grandis***



## 1. RESUMO

A expressão de genes do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica foi avaliada utilizando-se a técnica de micorrização *in vitro* visando a construção de uma biblioteca subtrativa de cDNA. O fungo foi cultivado na presença de raízes de *Eucalyptus grandis*, sem, no entanto, haver contato das hifas com o sistema radicular da planta hospedeira. Foram identificados genes que codificam possíveis proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético, transcrição e síntese de proteínas, comunicação celular, transdução de sinal, resposta a estresse, transposons e proteínas relacionadas à biogênese de componentes celulares. A expressão dos genes que codificam piruvato desidrogenase, ATP sintase, proteína do canal seletivo de íon dependente de voltagem, acetil-CoA acetiltransferase e hidrofobina foi avaliada por RT-PCR quantitativo. A expressão diferencial destes genes durante a fase pré-simbiótica confirmou a ativação dos genes relacionados à beta-oxidação e ao metabolismo mitocondrial nesta fase da associação, além de validar a biblioteca subtrativa supressiva construída.

**Palavras chave:** Ectomicorriza, *Hydnangium*, fase pré-simbiótica, expressão gênica, hibridização subtrativa supressiva.

## 2. INTRODUÇÃO

Ectomicorrizas são associações simbióticas entre raízes de plantas e fungos do solo, caracterizadas por apresentarem uma camada de hifas, o manto, que recobre as células da epiderme radicular, a rede de Hartig, formada pelo crescimento das hifas nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex, e uma rede de hifas que interligam as micorrizas ao solo e aos basidiocarpos (Smith & Read, 1997).

Os benefícios dessa interação incluem, para o fungo, suprimento de carbono para sua sobrevivência e multiplicação e, para planta, maior absorção de água e nutrientes do solo, maior tolerância às condições ambientais adversas, absorção mais eficiente dos nutrientes do solo, além da proteção das raízes contra o ataque de patógenos (Marx, 1969; Trappe, 1977; Le Tacon et al., 1987; Marschner, 1992).

O fungo ectomicorrízico *Hydnangium* é um basidiomiceto pertencente à família Hydnangiaceae. Produz basidiocarpos hipógeos ou sub-epígeos. Foram descritas 70 espécies do gênero *Hydnangium*, que apresenta especificidade ao gênero *Eucalyptus* (Malajczuk et al., 1982; Malajczuk & Hartney, 1986; Index Fungorum, 2008). Apresenta ampla ocorrência na Austrália, Nova Zelândia, Portugal, Espanha, Estados Unidos (Malajczuk et al., 1982; Chu-chou & Grace, 1983; Zipcodezoo, 2008), e, em 2004, houve o primeiro relato deste fungo

no Brasil, em plantações comerciais de *Eucalyptus grandis*, no estado de Minas Gerais. Após o isolamento, o fungo foi caracterizado apresentando crescimento micelial intenso, além da formação de basidiocarpos (Campos, 2004).

A família Hydnangiaceae é composta por fungos pertencentes ao gênero *Hydnangium* e *Laccaria*. Devido a sua ampla distribuição, ao grande número de espécies, à disponibilidade de isolados cultivados *in vitro* e ao emprego nos estudos de ectomicorrizas, *Hydnangium* e *Laccaria* representam modelos para estudos de diversidade, biogeografia e especificidade em relação aos hospedeiros (Mueller & Hosaka, 2008).

A formação da micorriza pode ser dividida em quatro estágios: pré-infecção, colonização, diferenciação e funcionamento. No estágio de pré-infecção, também chamado de pré-simbiótico, raízes das plantas e o fungo trocam sinais no solo levando à determinação da compatibilidade da simbiose. Após o reconhecimento mútuo, as raízes e o micélio fúngico iniciam o crescimento e o contato físico é estabelecido. Após, a hifa cresce gradualmente e diferencia-se dentro do córtex da raiz formando a micorriza funcional (Martin et al., 1997; Smith & Read, 1997; Tagu et al., 2002).

Ao contrário de algumas interações planta-microrganismo, em que a natureza das moléculas sinalizadoras e do processo de percepção e transdução de sinais é conhecida, na associação ectomicorrízica este processo ainda não foi elucidado (Martin et al., 2001).

As plantas liberam para rizosfera metabólitos como flavonóides, rutina, citocinina, zeatina, que modificam a morfologia das hifas dos fungos (Lagrange et al., 2001). Quando presente, em baixas concentrações no meio de cultivo, rutina estimula o crescimento de *Pisolithus tinctorius*, enquanto a citocinina e zeatina modificam o ângulo de ramificação das hifas (Lagrange et al., 2001). Além disso, exsudatos contendo zeatina promovem acúmulo de moléculas fúngicas, como hipaforina, que induz mudanças nos pêlos radiculares de mudas de *Eucalyptus*

(Béguiristain & Lapeyerie, 1997). Hipaforina secretada pelo fungo *P. tinctorius* induziu mudanças morfológicas nas raízes de mudas de *Eucalyptus*, como diminuição na taxa de alongação dos pêlos radiculares com dilatação no ápice da raiz. Estas características morfológicas indicam efeito antagonista da hipaforina em relação à auxina (Ditengou et al., 2000).

Estudos visando identificar quais os genes que estão relacionados aos eventos que ocorrem durante a fase pré-simbiótica, que precede o contato entre a planta e o fungo, cruciais na determinação, direcionamento e estabelecimento da associação ectomicorrízica, vêm sendo desenvolvidos (Podila et al., 2002; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008).

Mudanças fisiológicas e morfológicas observadas ao longo do desenvolvimento da ectomicorriza são concomitantes com mudanças na expressão de genes em ambos os parceiros, tendo início antes do contato físico entre eles (Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005). O estabelecimento da simbiose ectomicorrízica é acionado por sinais produzidos por ambos os parceiros (Ditengou et al., 2000; Kawano et al., 2001; Lagrange et al., 2001; Martin et al., 2001). Estes sinais levam às mudanças morfológicas e um complexo desenvolvimento de estruturas específicas na planta e no fungo.

Dentre as diversas técnicas utilizadas para avaliação da expressão gênica, a hibridização subtrativa supressiva possibilita a obtenção de transcritos que são expressos somente em uma situação pela comparação de duas populações de mRNAs (Diatchenko et al., 1996). Esta técnica já foi utilizada com sucesso na identificação de genes diferencialmente expressos na fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica em outros sistemas, como *Laccaria bicolor* e *Pinus resinosa*, *Piloderma croceum* e *Quercus robur* e *Tuber borchii* e *Tilia americana* (Podila et al., 2002; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004).

O objetivo do trabalho foi identificar genes do fungo *Hydnangium* sp. diferencialmente expressos na fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica com *Eucalyptus grandis*, utilizando a técnica de hibridização subtrativa supressiva.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos e condições de cultivo

Utilizou-se neste estudo o fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp., da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, MG. As culturas do fungo foram mantidas em placas de Petri contendo o meio MNM - Melin Norkrans Modificado (Marx, 1969), a 28 °C, transferidas para novos meios de cultura a cada 20 dias.

#### 3.2. Interações entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* *in vitro*

As interações *in vitro* foram feitas segundo o protocolo descrito por Burgess et al. (1996), com modificações. Sementes de *E. grandis* (0,4-0,7 mm de diâmetro) foram imersas por um minuto com etanol 70 %, lavadas com água esterilizada, desinfestadas superficialmente com peróxido de hidrogênio (20 %) por seis minutos e lavadas três vezes com água esterilizada. Após a desinfestação superficial, as sementes foram transferidas para placas, contendo 30 mL de meio de síntese coberto com papel celofane, e incubadas a 28 °C por três dias. Após a germinação das sementes, cinco plântulas foram transferidas para nova placa de Petri contendo meio de síntese. As placas de Petri foram seladas, inclinadas com ângulo de 70°

e transferidas para câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e 16 h de luz com intensidade de 80  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ap\u00f3s 15 dias, as ra\u00edzes das pl\u00e2ntulas foram cobertas com papel celofane e, discos de \u00e1gar de 10 mm de di\u00e2metro, contendo mic\u00e9lio, retirados das bordas de col\u00f4nias de *Hydnangium* sp. cultivados por sete dias a 28 °C no meio MNM, foram inoculados. Placas de Petri com o isolado f\u00fangico, sem a pl\u00e2ntula, foram mantidas de forma id\u00eantica. As placas permaneceram na câmara de crescimento por 15 dias e ap\u00f3s este per\u00edodo, o mic\u00e9lio foi coletado e armazenado a -80 °C. Dessa forma, foram estabelecidos dois tratamentos: o fungo cultivado na presen\u00e7a da planta (amostra *tester*) e o fungo cultivado na aus\u00eancia da planta (amostra *driver*).

### **3.3. Constru\u00e7\u00e3o da biblioteca subtrativa supressiva**

A extra\u00e7\u00e3o de RNA total do mic\u00e9lio f\u00fangico cultivado nos dois tratamentos foi realizada utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Brasil), conforme instru\u00e7\u00f5es do fabricante. O mRNA foi isolado utilizando o kit “PolyATtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems” (Promega, Madison, USA).

O DNA complementar foi obtido a partir do mRNA dos mic\u00e9lios f\u00fangicos utilizando o kit “SMART PCR cDNA Synthesis Kit” (Clontech Laboratories, Palo Alto, Calif\u00f3rnia), segundo as instru\u00e7\u00f5es do fabricante.

A t\u00e9cnica de hibridiza\u00e7\u00e3o subtrativa supressiva foi utilizada para preparar a biblioteca de cDNAs subtra\u00edda enriquecida de fragmentos de DNA, que representam genes diferencialmente expressos no mic\u00e9lio cultivado na presen\u00e7a da planta (fase pr\u00e9-simbi\u00f3tica), e foi realizada utilizando o kit “Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit” (Clontech Laboratories, Palo Alto, Calif\u00f3rnia), conforme as instru\u00e7\u00f5es do fabricante.

### 3.4. Teste de eficiência da hibridização subtrativa

O cDNA subtraído e o cDNA não subtraído foram diluídos para mesma concentração final. A reação de PCR foi realizada utilizando 1 µL das preparações de cDNAs diluídas, Buffer Go Taq Flexi Promega 1X (Promega, Madison, USA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleosídeos trifosfatados, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 1 U de Go Taq Flexi Promega (Promega, Madison, USA).

Baseando-se no banco de seqüências de *Laccaria bicolor*, oligonucleotídeos foram desenhados visando à amplificação de uma região do gene que codifica beta tubulina de *Hydnangium* sp. O produto de PCR avaliado por eletroforese apresentou um fragmento de DNA de 206 pb que foi purificado e seqüenciado. Esta seqüência foi comparada com seqüências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1997), confirmando a similaridade dos aminoácidos traduzidos desta seqüência com os aminoácidos de proteínas de beta tubulina de outros organismos.

Para avaliação do teste de eficiência, foram utilizados os oligonucleotídeos BTUBHYD1 5'-AGGAGGCTGAAGGGACAGAC-3' e BTUBHYD2 5'-TCAAGAGGGTTCCCATACCA-3', que foram desenhados a partir da região da seqüência do gene que codifica beta tubulina do *Hydnangium* sp., que não possui sítio para a enzima *Rsa*I. As condições de amplificação foram: 33 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. Foram retiradas alíquotas de 5 µL nos ciclos 18, 23, 28 e 33, e analisadas por eletroforese em gel de agarose 2 %, contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL.



### **3.5. Clonagem do produto final da hibridização subtrativa supressiva no vetor pGEM-T Easy e seqüenciamento**

Os fragmentos de cDNA amplificados, proveniente da hibridização subtrativa supressiva do micélio de *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica, foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA), segundo as instruções do fabricante.

Células ultracompetentes de *E. coli* DH5a foram transformadas com a reação de ligação, segundo Inoue et. al. (1990). Os clones bacterianos recombinantes, cultivados em meio Luria Bertani (Sambrook et al., 1989) contendo ampicilina (50 µg/mL) e isopropil-β-D-tiogalacturonasídeo (X-Gal) foram selecionados.

Para verificar o tamanho dos fragmentos de cDNA clonados no vetor pGEM, 40 colônias de bactérias recombinantes foram transferidas com um palito estéril para um tubo de microcentrífuga, contendo 50 µL de água deionizada. Os tubos foram colocados a 100 °C por cinco minutos, centrifugados por dois minutos a 7000 g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Na reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos M13F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' e M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' a uma concentração de 0,4 µM, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, Buffer IB na concentração 1 X, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) e 2 µL do sobrenadante dos clones bacterianos. As condições de amplificação incluíram um passo de desnaturação inicial de 1 min a 94 °C, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL.

O DNA plasmidial dos clones bacterianos foi extraído e seqüenciado utilizando o oligonucleotídeo M13F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3', pelo método de

Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando o seqüenciador MegaBase 1000 DNA Analysis System (Molecular Dynamics e Life Science).

### **3.6. Anotações das seqüências da biblioteca subtrativa**

As seqüências obtidas que representam a biblioteca subtrativa foram submetidas ao programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para retirada das seqüências provenientes do vetor. Após esse procedimento, o programa Cap3 (<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.html>) foi utilizado visando agrupar as seqüências e montagem dos contíguos. Estas seqüências foram comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1997). Só foram considerados os alinhamentos entre as seqüências de aminoácidos deduzidos a partir das seqüências de nucleotídeos da biblioteca subtrativa e de aminoácidos do banco de dados que obtiveram valor  $e < 10^{-4}$ . O valor  $e$ , *expectation value* – *e-value*, representa a probabilidade de que a similaridade encontrada seja devido ao acaso.

Para definir as categorias funcionais das seqüências avaliadas foi utilizado o banco de dados MIPS (<http://mips.gsf.de/projects/funecat>).

### **3.7. Validação da biblioteca subtrativa da interação pré-simbiótica de *Hydnangium sp.* e *Eucalyptus grandis***

Para validar a biblioteca subtrativa supressiva construída, foi utilizada a reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR), comparando a expressão de genes expressos no fungo *Hydnangium sp.*, cultivado na presença da planta, em relação ao fungo cultivado na ausência da planta.

Desta forma, utilizaram-se os mRNAs isolados para construção da biblioteca subtrativa supressiva. As reações de síntese da 1ª fita de cDNA foram realizadas em volume total de 20  $\mu$ L, contendo 200 ng do mRNA, Tampão Improm II

Transcriptase Reversa Promega (Promega, Madison, USA) 1X, 0,5 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, 500 ng de oligo dT, 20 U de inibidor de ribonuclease RNAsin® e 10 U de “Avian Myeloblastosis Vírus Reverse Transcriptase” (Promega, Madison, USA). A reação foi submetida a 42 °C por 90 min.

Os experimentos de quantificação relativa da expressão de genes relacionados à micorrização foram conduzidos no sistema de PCR em tempo real 7500 (Applied Biosystems, California, USA), seguindo instruções do fabricante. As seqüências dos oligonucleotídeos para análise por RT-qPCR foram determinadas no programa Real-Time PCR Primer Design (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>), baseadas nas seqüências de cDNA da biblioteca subtrativa supressiva construída (Tabela 1).

O método escolhido para amplificação foi o de Curva Padrão Relativa. Nesta técnica, utilizam-se diluições seriadas (curvas-padrão) para o gene alvo e um controle endógeno em cada reação, e as amostras são interpoladas nessas curvas para quantificação. O controle endógeno utilizado foi o gene da beta tubulina. Assim, normalizou-se a amplificação do gene alvo com a amplificação do controle endógeno, para correção de variações de amplificação devido à quantidade de material inicial presente nas amostras, condições de processamento e presença de inibidores de PCR. As amostras foram amplificadas em triplicatas.

Para reação de PCR foram utilizados 1 µL da 1ª fita de cDNA, 0,2 µM da cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) para concentração final de 1 X, em uma reação de 25 µL.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para avaliação da expressão de genes e validação da biblioteca subtrativa da interação pré-simbiótica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis*

Clone	Oligonucleotídeos	Sequencia 5'-3'
D12SH1	D12SH1_L1	GTTGCACTCCCATCAACATC
	D12SH1_R1	GCACCTCTAGCATTGGAACG
A02aSH2	A02aSH2_L1	GACTCAACTGAGCTCCACGA
	A02aSH2_R1	CCCAACAATTCTTCCTTGGT
A05SH3	A05SH3_L1	AATGAGCTCCTGGATCAACA
	A05SH3_R1	GTTGTGCGACCTCCTTGCC
D02SH3	D02SH3_L1	GTCGCGACCAATGACAGTAT
	D02SH3_R1	TTCCCTCCTTCCAGAGAAGA
D09SH3	D09SH3_L1	GATGTTGAAGACCGGTAGCA
	D09SH3_R1	GGGTCAAAGAGATTGGCATT
	BTUB_L1	AGGAGGCTGAAGGGACAGAC
	BTUB_R1	TCAAGAGGGTTCCCATACCA

#### 4. RESULTADOS

A técnica de micorrização *in vitro* foi eficiente para obtenção de micélio do fungo *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica da interação com *Eucalyptus grandis* visando a construção da biblioteca substrativa supressiva (Figura 1).

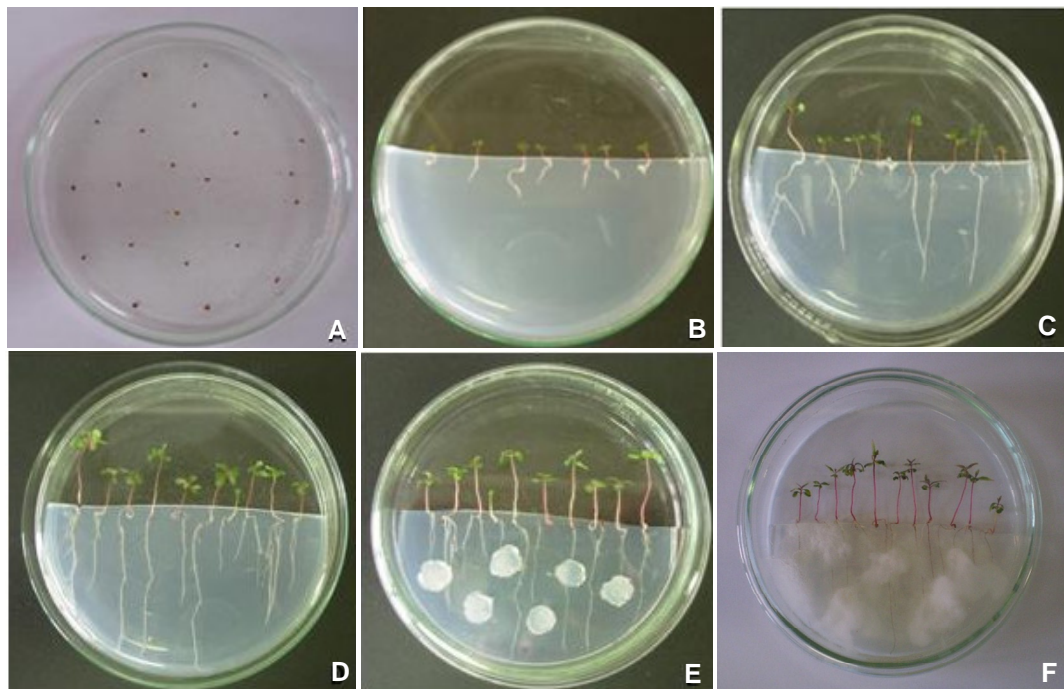


Figura 1. Micorrização *in vitro*. Sementes de *Eucalyptus grandis* colocadas sobre o meio de síntese após a desinfestação (A), plântulas de *E. grandis*, um dia (B), sete dias (C) e 15 dias (D) após transferência para o meio de síntese. Plântulas de *E. grandis* com 15 dias após transferência, e logo após a inoculação com *Hydnangium* sp (E) e 15 dias após a inoculação (F).

Uma biblioteca subtrativa de cDNA, representando os genes diferencialmente expressos do fungo *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica, foi construída para avaliar a eficiência de subtração. O cDNA subtraído e o cDNA não subtraído foram amplificados utilizando oligonucleotídeos do gene que codifica beta tubulina de *Hydnangium* sp. e uma diminuição na amplificação do cDNA subtraído em relação ao cDNA não subtraído foi observada. Isto demonstra que foi construída uma biblioteca subtrativa de cDNA de alta qualidade, representando os genes diferencialmente expressos e a supressão dos genes de expressão constitutiva, como é o caso do gene que codifica a beta tubulina (Figura 2).

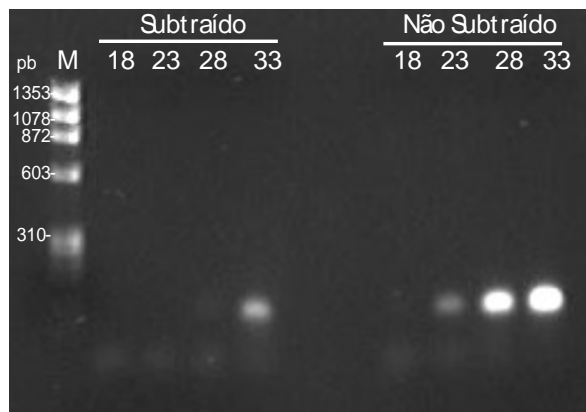


Figura 2. Teste de eficiência de subtração. Eletroforese em gel de agarose a 2 % dos produtos de amplificação do cDNA subtraído e não subtraído com os oligonucleotídeos BTUBHYD1 e BTUBHYD2, nos ciclos 18, 23, 28 e 33. M: Marcador  $\phi$ X174/*Hae*III.

O tamanho dos fragmentos de cDNA amplificados, proveniente da hibridização subtrativa supressiva, clonados no vetor pGEM, foram verificados por PCR, sendo observado insertos com tamanho variando de 300 a 1700 pb (Figura 3).



Figura 3. Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de cDNA clonados, amplificados com os oligonucleotídeos M13F e M13R. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos de amplificação. M: Marcador  $\phi$ X174/*Hae*III.

Uma vez que foi observado polimorfismo de tamanho dos fragmentos de cDNA clonados, indicando que a biblioteca é composta de diferentes cDNAs, ou seja, que há baixa redundância, 274 fragmentos de cDNA foram seqüenciados utilizando o oligonucleotídeo M13F. Dentre as seqüências obtidas, 168 foram selecionadas, sendo que as demais, ou mostravam seqüências somente do vetor, ou erros de seqüências ou ainda eram menores do que 200 pb. O programa CAP3 foi utilizado para identificar seqüências repetidas e agrupá-las em contíguos (*contig*) e identificar seqüências únicas (*singlets*). Após essas avaliações, 131 *ESTs* (*expressed sequence tags*) foram selecionadas e comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o algoritmo BLASTX. O programa BLASTX compara os possíveis produtos da tradução de uma seqüência de nucleotídeos com seqüência de aminoácidos do banco de dados. A similaridade foi considerada significativa quando o valor  $e$  foi inferior a  $10^{-4}$ .

Quarenta e quatro seqüências de aminoácidos traduzidas dos *ESTs* apresentaram valor  $e < 10^{-4}$  (33,6 %), 45 apresentaram valor  $e = 10^{-4}$  (34,4 %) e 42 não apresentaram similaridade com nenhuma proteína depositada no banco de dados (32 %).

Para identificação das possíveis proteínas codificadas pelas seqüências de cDNA da biblioteca subtrativa supressiva, as seqüências traduzidas dos *ESTs* foram comparadas com as seqüências de proteínas depositadas no banco de dados NCBI. Para anotação de cada seqüência de *EST*, foi considerada a proteína que apresentou o menor valor e. Porém, quando a proteína que apresentava menor valor e era uma proteína hipotética, foram consideradas proteínas com maiores valores e que apresentavam função conhecida.

Desta forma, dentre as 44 seqüências de *ESTs* que foram traduzidas e comparadas com as seqüências de aminoácidos do banco de dados do NCBI com valor e inferior a  $10^{-4}$ , 26 apresentaram similaridade com proteínas com funções conhecidas e 18 com proteínas hipotéticas. Foi observado que 36% das seqüências de aminoácidos traduzidas dos 44 *ESTs* apresentaram similaridade com proteínas do fungo *Laccaria bicolor*, que teve seu genoma disponibilizado no NCBI em março de 2006.

Os genes identificados foram agrupados em categorias funcionais de acordo com o banco de dados MIPS (Figura 4).

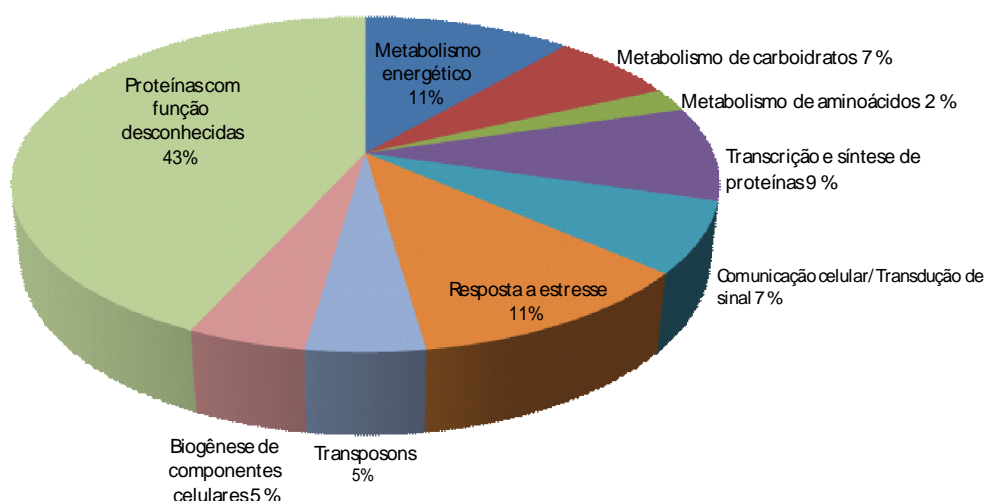


Figura 4. Classificação funcional dos cDNAs da biblioteca subtrativa de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* segundo o banco de dados MIPS.



#### 4.1. Possíveis proteínas detectadas *in silico* a partir das análises dos genes diferencialmente expressos na fase pré-simbiótica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis*

##### 4.1.1. Metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético

Várias proteínas relacionadas com diferentes vias metabólicas foram diferencialmente expressas, como às relacionadas a  $\beta$ -oxidação e à cadeia respiratória mitocondrial (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca subtrativa supressiva do fungo *Hydnangium* sp. durante a fase pré-simbiótica da associação de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* relacionadas ao metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético

Clone/ Contiguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Possível proteína/organismo	Valor e
<b>Metabolismo de carboidratos</b>				
H01SH3	733	XP_001876645	Acetil-CoA acetiltransferase Peroxissomal/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	2.00E-65
D09SH3	378	AAK26620	Acetil-coA acetil transferase/ <i>Laccaria bicolor</i>	1.00E-11
Contig9	276	YP_445294	Amidohidrolase/ <i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855	1.00E-10
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>				
F07SH3	459	XP_001873960	Metilmalonato semialdeído desidrogenase/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	1.00E-63
<b>Metabolismo energético</b>				
D10SH3	594	XP_572836	ATP sintase vacuolar/ <i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>	2.00E-68
A05SH3	416	XP_001833020	Cadeia beta da ATP sintase/ <i>Coprinopsis</i> <i>cinerea okayama7#130</i>	1.00E-62
A02aSH2	591	XP_001881742	Componente E1 da subunidade B da piruvato desidrogenase mitocondrial/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	1.00E-59
D11SH1	305	NP_592817	NADPH desidrogenase/ <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4.00E-14
A09aSH2	300	NP_986602	AGL064Wp/ <i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895	5.00E-06

#### 4.1.2. Transcrição e síntese de proteínas

Foram identificadas diferentes proteínas relacionadas à transcrição e à síntese de proteínas como a RNA polimerase II, subunidade 40S, aspartil-tRNA sintetase e peptidil-prolil cis-trans isomerases (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca subtrativa supressiva do fungo *Hydnangium* sp. durante a fase pré-simbiótica da associação de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* relacionadas aos processos de transcrição e de tradução

Clone/ Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Possível proteína/organismo	Valor e
G05SH2		XP_754866	Peptidil-prolil- cis-trans isomerase/ <i>Aspergillus fumigatus</i>	2.00E-53
E03aSH3	345	AAW72748	Subunidade maior da RNA polimerase II/ <i>Climacodon septentrionalis</i>	1.00E-32
B11SH2	548	XP_963431	Proteína 40S ribossomal/ <i>Neurospora crassa</i>	3.00E-14
H09SH2	814	XP_001938116	Aspartil-tRNA sintetase/ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	4.00E-06

#### 4.1.3. Comunicação celular, transdução de sinal e resposta a estresse

Várias proteínas putativas, relacionadas à comunicação celular e à transdução de sinal foram identificadas. Dentre elas, a proteína que constitui o canal seletivo de íon dependente de voltagem, precursor de protease Apr e cinase serina e treonina Ste20-like (Tabela 4).

Na associação *Medicago truncatula* e fungos micorrízicos arbusculares, foi relatada a provável função do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no início da interação (Lévy et al., 2004; Sanchez et al., 2005). O íon  $\text{Ca}^{2+}$  possivelmente tem papel como mensageiro secundário durante a formação do apressório. Este fato tem sido relatado também para fungos patogênicos, indicando que estes, juntamente com os simbióticos, devem compartilhar, pelo menos em parte, uma cascata de sinalização (Balestrini & Lanfranco, 2006).

Tabela 4. Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca subtrativa supressiva do fungo *Hydnangium* sp. durante a fase pré-simbiótica da associação de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis*, relacionadas à comunicação celular/transdução de sinal e resposta a estresse

Clone/ Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Possível proteína/organismo	Valor e
<b>Comunicação celular e transdução de sinal</b>				
Contig14	1110	XP_569804	Proteína de canal seletivo de íon dependente de voltagem/ <i>Cryptococcus neoformans</i>	1.00E-14
H10bSH2	283	CAH03670	Precursor de protease Apr/ <i>Bacillus licheniformis</i>	1.00E-14
C08SH1	441	XP_001876676	Cinase serina e treonina Ste20-like/ <i>Laccaria bicolor</i>	3.00E-11
<b>Resposta a estresse</b>				
H11SH3	477	XP_572454	2-nitropropano dioxigenase/ <i>Cryptococcus neoformans</i>	1.00E-34
A11SH1	469	ACB69805	Proteína like citocromo P450/ <i>Heterobasidion annosum</i>	2.00E-22
C12SH2	333	ACF15452	Glutathiona-S-transferase/ <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	7.00E-20
A07SH1	353	AAS46751	Reductase AKOR2/ <i>Pleurotus djamor</i>	3.00E-19
F03SH2	335	XP_001879250	Peroxirredoxina/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	1.00E-18

As enzimas serina e treonina cinases são enzimas relacionadas à via de transdução de sinal e foram identificadas nas associações de *E. globulus* e *P. microcarpus* com doze dias de interação, *E. globulus* e *P. tinctorius*, no quarto dia, nas raízes de *P. sylvestris* inoculadas com *L. bicolor* e nas raízes de *Q. robur* inoculadas com o fungo ectomicorrízico *P. croceum* (Voiblet et al., 2001; Duplessis et al., 2005; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008).

Em plantas, há relatos que fungos micorrízicos podem induzir resposta a estresse similar a respostas induzidas por fungos patogênicos (Lamb & Dixon, 1997; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). As respostas incluem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), indução da transcrição de genes relacionados à destoxificação de espécies reativas de oxigênio e síntese de proteínas relacionadas à patogênese.

No grupo de proteínas de *Hydnangium* sp. relacionadas a estresse podemos evidenciar as relacionadas à síntese de espécies reativas de oxigênio, como 2-nitropropano dioxigenase e uma redutase similar a redutase AKOR2 de *Pleurotus djamor* e destoxificação celular, como glutathione S-transferase, citocromos P450 e peroxirredoxina.

A redutase AKOR2 de *P. djamor* pertence à família de oxidoredutase dependente de NADPH. Em plantas, a enzima NADPH oxidase utiliza o NADPH para reduzir o oxigênio molecular a  $O_2^-$ , que pode ser rapidamente convertido a  $H_2O_2$ , que são espécies reativas de oxigênio. A indução da produção destes compostos esta relacionada a resposta de defesa da planta (Mehdy et al., 1996).

Atividade da enzima glutathione S-transferase tem sido descrita como possível fator de virulência em *Botrytis cinerea*, uma vez que a presença desta enzima resultou na proteção do fungo contra compostos fungitóxicos produzidos pela planta (Prins et al., 2000).

Os citocromos P450 são proteínas associadas à membrana e apresentam função de degradação de toxinas e compostos hidrofóbicos (Aninat et al., 2005). Nos fungos fitopatogênicos, os citocromos P450 são classificados como fator de virulência, atuando na destoxificação de antibióticos e toxinas, produzidas pelo sistema de defesa das plantas (George & Vanetten, 2001; Khan et al., 2003).

#### **4.1.4. Transposons e biogênese de componentes celulares**

Foram identificadas a transposase IS10 de *Salmonella typhi* e a transposase de *Escherichia coli*. Os elementos transponíveis são responsáveis por grande número de mutações espontâneas, gerando modificações na expressão dos genes, alteração das seqüências de bases e modificações estruturais nos cromossomos (Deschamps et al., 1999; Langin et al., 1995; Hua-Van et al., 1998, 2000, 2001).

Os microrganismos apresentam a capacidade de sobrevivem em ambientes diversos, utilizando diferentes substratos e desempenhando papéis ecológicos diversos. Esta capacidade está relacionada a modificações genéticas, geradas, em parte, pelos elementos transponíveis (Daboussi, 1997; Edell et al., 2001, Daboussi & Capy, 2003).

Tabela 5. Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca subtrativa supressiva do fungo *Hydnangium* sp. durante a fase pré-simbiótica da associação de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* relacionadas a transposons e biogênese de componentes celulares

Clone/ Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Possível proteína/organismo	Valor e
<b>Transposons</b>				
A11SH4	674	NP_058298	Transposase IS10/ <i>Salmonella typhi</i>	5.00E-26
E07SH1	778	AAT00497	Transposase/ <i>Escherichia coli</i>	1.00E-05
<b>Biogênese de componentes celulares</b>				
Contig17	609	ABA46363	Hidrofobina 1/ <i>Heterobasidion annosum</i>	2.00E-23
H11SH2	366	XP_001936021	Precursor da endoglucanase 1/ <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	6.00E-13

Identificou-se também um gene que codifica hidrofobina, proteína relacionada a biogênese de componentes celulares. As hidrofobinas são proteínas hidrofóbicas que apresentam cerca de 100 aminoácidos, encontradas comumente em fungos filamentosos. São secretadas e ficam dispostas em camadas na superfície externa da parede celular de hifas e conídios, onde mediam interações entre os fungos e o ambiente. Desempenham papel funcional em processos envolvidos com crescimento e desenvolvimento, como montagem da parede celular, além de poder atuar como toxinas e elicitores (Wosten, 2001; Whiteford & Spanu, 2002).

Como observado em fungos que colonizam serrapilheiras em florestas, foi identificado um gene que codifica um precursor de endoglucanase (Tabela 5). Estes fungos secretam enzimas que hidrolizam celulose e lignina, dois dos principais componentes da parede celular das plantas. A degradação da celulose envolve a ação sinérgica das exocelobiohidrolases e endoglucanases (Cullen, 2008).

#### 4.1.5. Proteínas com função não conhecida

Um grande número de seqüências de aminoácidos disponíveis nos bancos de dados, que apresentaram similaridade com as seqüências de aminoácidos traduzidas da biblioteca subtrativa não têm função conhecida (Tabela 6). Dentre elas, a proteína CipC, proteína tipo C induzida por canamicina, de *L. bicolor*. Apesar da função desta proteína não ter sido elucidada, ocorreu aumento na sua síntese quando *A. nidulans* foi crescido no meio contendo concanamicina, promovendo mudanças drásticas na morfologia das hifas (Melin et al., 2002). A quantidade de transcritos do gene que codifica esta proteína foi 21,4 vezes maior na ectomicorriza com 12 semanas de interação entre *P. involutus* e *B. pendula* do que a no micélio de vida livre. Acredita-se que a ativação do gene *cipC* deve estar ligado a mudanças na morfologia durante o crescimento do fungo (Morel et al., 2005).

Outra proteína com função não conhecida identificada na biblioteca subtrativa supressiva de *Hydnangium* foi uma proteína relacionada à simbiose, já descrita em *L. bicolor*. Um gene codifica uma proteína relacionada à simbiose em *L. laccata* (*aut7*) pode estar envolvida no transporte vacuolar e autofagocitose. A transcrição desse gene foi aumentada duas vezes na ectomicorriza em relação ao micélio extrarradical de *P. involutus* e *B. pendula* (Morel et al., 2005). O transcrito *aut7* não foi detectado no micélio de vida livre, mas foi detectado na interação simbiótica com a planta hospedeira. A proteína codificada por este gene tem papel crucial durante a colonização da raiz pelo fungo (Kim et al., 1999).

Tabela 6. Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca subtrativa supressiva do fungo *Hydnangium* sp. durante a fase pré-simbiótica da associação de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* com função desconhecida

Clone/ Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Possível proteína/organismo	Valor e
<b>Proteínas com funções desconhecidas</b>				
Contig8	600	XP_001876256	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	1.00E-44
D11SH3	623	XP_001828572	Proteína hipotética CC1G_11224/ <i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	2.00E-43
D01SH2	375	XP_001878658	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	4.00E-33
F09aSH2	510	XP_001881785	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	8.00E-24
E02SH3	548	AAB53650	Proteína relacionada a simbiose/ <i>Laccaria bicolor</i>	1.00E-18
Contig18	517	XP_001830463	Proteína predita/ <i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	4.00E-17
Contig4	828	XP_001879340	Proteína CipC1/ <i>Laccaria bicolor</i>	5.00E-15
H06aSH2	374	XP_001272266	Proteína hipotética conservada/ <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	5.00E-15
G08SH2	391	XP_001728955	Proteína hipotética MGL_3949/ <i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	2.00E-11
F08SH1	292	XP_001877199	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	6.00E-10
H08SH3	263	XP_001882666	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	3.00E-10
H12aSH2	417	XP_001876100	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	9.00E-09
E03SH2	571	XP_001841141	Proteína hipotética CC1G_08285/ <i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	2.00E-08
B12aSH3	245	XP_570733	Proteína hipotética/ <i>Cryptococcus neoformans var. neoformans</i> JEC21	2.00E-08
Contig12	312	XP_760163	Proteína hipotética UM04016.1/ <i>Ustilago maydis</i> 521	3.00E-07
B10SH4	350	BAD07869	Proteína hipotética/ <i>Oryza sativa</i> Japonica Group	3.00E-07
G12aSH3	316	XP_001884448	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	7.00E-06
Contig10	399	XP_001877734	Proteína predita/ <i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	7.00E-05
E02SH4	288	XP_001828791	Proteína predita/ <i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	1.00E-05

#### 4.2. Validação da biblioteca subtrativa da interação pré-simbiótica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis*

A expressão de genes do fungo *Hydnangium* sp., cultivado na presença das raízes da planta hospedeira (*tester*) em relação ao fungo cultivado em vida livre (*driver*), foi avaliada pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR). Foram avaliados os genes que possivelmente codificam hidrofobina

(D12SH1), piruvato desidrogenase (A02aSH2), ATP sintase (A05SH3), canal seletivo de íon dependente de voltagem (D02SH3) e acetil-CoA acetiltransferase (D09SH3), e, observou-se que todos apresentaram aumento na expressão no micélio de *Hydnangium* sp. cultivado na presença da planta em relação ao micélio cultivado na ausência da planta, validando a biblioteca subtrativa supressiva construída (Figura 5).

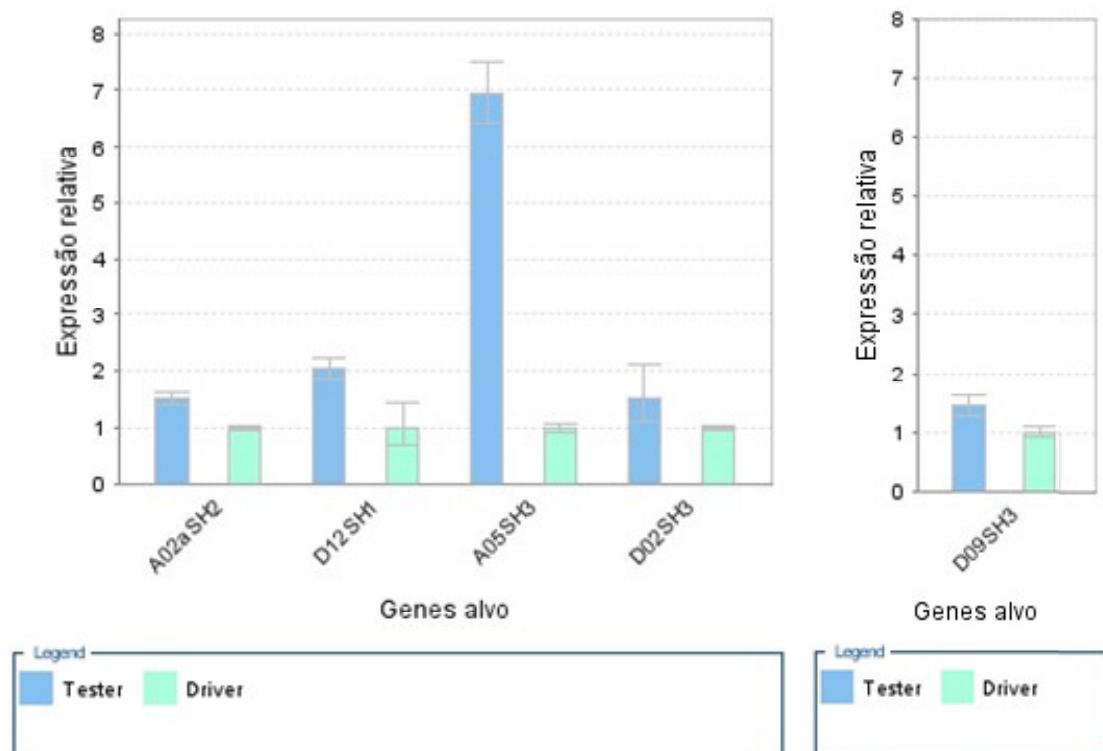


Figura 5. Expressão de genes do fungo *Hydnangium* sp., cultivado na presença da planta (*tester*) em relação ao fungo cultivado na ausência da planta (*driver*). O eixo x apresenta os genes alvo e o eixo y, o nível de expressão gênica correspondente à expressão dos genes alvo em relação ao calibrador (*tester*), normalizado pelo controle endógeno beta tubulina. Foram avaliados os genes que possivelmente codificam piruvato desidrogenase (A02aSH2), hidrofobina (D12SH1), ATP sintase (A05SH3), canal seletivo de íon dependente de voltagem (D02SH3) e acetil-CoA acetiltransferase (D09SH3).



## 5. DISCUSSÃO

Técnicas para análise genômica, a exemplo dos microarranjos de DNA e da hibridização subtrativa supressiva, têm sido utilizadas para se avaliar o desenvolvimento e o funcionamento das ectomicorrizas em nível molecular, permitindo a identificação de genes e a análise funcional dos mesmos. Devido ao grande número de genes e sinais envolvidos, essas ferramentas genômicas são adequadas para estudar eventos moleculares que ocorrem nas interações simbióticas (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Peter et al., 2003; Menotta et al., 2004; Duplessis et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008).

Vários genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e energético foram identificados na biblioteca subtrativa de *Hydnangium* sp (Tabela 1). O processo de interação com as raízes desencadeia mudanças no micélio fúngico que levam ao seu desenvolvimento e proliferação. Durante essa fase, o fungo deve reorientar seu metabolismo no sentido de favorecer e permitir a formação e funcionamento da ectomicorriza (Podila et al., 2002).

Um cDNA correspondente ao gene acetil-coA acetiltransferase de *Laccaria bicolor*, que foi expresso durante a fase pré-simbiótica da interação

com raízes de *P. resinosa* (Podila et al., 2002). Esses autores propuseram que o papel da acetil-coA acetiltransferase na simbiose é a produção de compostos com dois carbonos a partir dos lipídeos armazenados e geração de acetoacetil-CoA no início da interação, facilitando o desenvolvimento das hifas. Estes resultados combinados com análises de microarranjos revelaram a expressão coordenada da enzima malato sintase e outros genes relacionados ao metabolismo de lipídeo com a acetil-coA acetiltransferase, sugerindo que esta proteína deve ser importante no processo de pré-infecção da simbiose ectomicorrízica e na transferência e utilização de carbono pelo fungo (Hiremath et al., 2006).

Vários genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons foram identificados na biblioteca subtrativa supressiva de *Hydnangium* sp. Durante a formação do manto e da Rede de Hartig, na interação ectomicorrízica entre *B. pendula* e *P. involutus*, foi observada a expressão de genes relacionados com a cadeia respiratória e ATP sintase (Le Quéré et al., 2005). Análises estruturais do compartimento da rede de Hartig têm revelado alto número de mitocôndrias, presentes nas hifas ramificadas localizadas entre as células epidérmicas das plantas (Massicotte et al., 1987; Smith & Read, 1997). Esta ativação da cadeia respiratória deve estar conectada com a ativação do metabolismo de carboidratos ao longo do ciclo do ácido cítrico.

A avaliação da expressão dos genes que codificam piruvato desidrogenase, ATP sintase, canal seletivo de íon dependente de voltagem e acetil-CoA acetiltransferase foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real (Figura 5). Foi observado aumento na expressão destes genes no fungo cultivado na presença da planta em relação ao fungo cultivado na ausência da planta, confirmando a ativação dos genes relacionados a beta oxidação e metabolismo mitocondrial na fase pré-simbiótica da associação, além de validar a biblioteca subtrativa supressiva construída.

Foram identificados na biblioteca construída, genes relacionados à transcrição e à síntese de proteínas (Tabela 3). A ativação de genes codificando proteínas envolvidas na transcrição e síntese de proteínas suporta o fato que as células ectomicorrízicas necessitam rearranjar a estrutura e o metabolismo para formar a ectomicorriza funcional (Morel et al., 2005).

A proliferação das raízes e do tecido fúngico, a necessidade de adaptação à alterações ambientais como variação de pH, aumento do fluxo de nutrientes e presença de espécies reativas de oxigênio requer a ativação de diferentes genes. A percepção deste novo ambiente e o desenvolvimento coordenado do fungo e da planta requerem uma rede de sinalização celular (Martin et al., 2001). Genes fúngicos, como PF6.2 e *ras* de *L. bicolor*, e *ras* de *P. tinctorius* são induzidos antes do contato físico, confirmando que elicitores estão envolvidos nos primeiros estágios da interação ectomicorrízica (Kim et al., 1998; Sundaram et al., 2001; Voiblet et al., 2001; Duplessis et al., 2005, Podila et al., 2002).

Genes que codificam proteínas como GTPases, *ras*, fosfoproteínas, fosfases dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, serina treonina cinases, canais de  $Ca^{2+}$ , dependente de voltagem, proteínas do canal de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  e ATPase têm sido relatados na fase pré-simbiótica de associações ectomicorrízicas (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002).

A indução da expressão de genes que codificam proteínas ligadas à destoxificação de compostos, como genes que codificam proteínas como citocromo P450, glutathione S-transferase e peroxirredoxina deve ter a função de proteger o fungo, permitindo a sua sobrevivência e a colonização do tecido vegetal, principalmente no início da interação.

Peroxirredoxina é uma proteína relacionada à destoxificação celular, que é capaz de destoxificar várias espécies reativas de oxigênio, como hidroperóxidos e peroxinitritos (Rouhier et al., 2002). Na associação ectomicorrízica *P. involutus* e *B. pendula*, foi observado que o gene que codifica a proteína rehidrina, uma

peroxirredoxina, teve sua expressão 2,2 vezes maior na ectomicorriza em relação ao micélio de vida livre (Morel et al., 2005).

No grupo de seqüências relacionadas à biogênese de componentes celulares, foi identificado o gene que codifica hidrofobina (Tabela 5). Entre os genes expressos mais abundantemente na diferenciação ectomicorrízica estão aqueles envolvidos na síntese da parede celular e matriz interfacial da simbiose (Martin et al., 1999). Genes que codificam hidrofobinas e manoproteínas são ativados no tecido simbiótico, sendo candidatos a marcadores para mudanças relacionadas à simbiose (Tagu et al., 1996; Laurent et al., 1999; Voiblet et al., 2001; Peter et al., 2003). Genes que codificam hidrofobinas foram ativados no início da associação ectomicorrízica entre *P. microcarpus* e *E. globulus*, quando as pontas das raízes foram colonizadas, porém, tiveram o nível de expressão constitutiva estabelecido na ectomicorriza com 12 e 21 dias (Duplessis et al., 2005).

Grande número de seqüências, 32 %, não apresentou similaridade com nenhuma proteína depositada no banco de dados (Tabela 6). Este fato já foi observado para vários fungos ectomicorrízicos (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Heller et al., 2008). Tem sido sugerido que estes genes são exclusivos da espécie do fungo estudado ou que eles devam representar transcritos raros que não têm sido identificados ou caracterizados até o momento (Podila et al., 2002). Sugere-se que estas seqüências possam representar genes que são transcritos somente no processo de micorrização, ou seja, genes específicos das ectomicorrizas.

A análise da expressão de genes do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica com *E. grandis* confirma e amplia resultados anteriores, onde alterações na morfologia associadas com o desenvolvimento da micorriza são acompanhados por alterações dos perfis transcricionais, e que uma série complexa de mecanismos moleculares são

acionados durante o primeiro estágio da formação da ectomicorriza, antes que a planta e o fungo estabeleçam o contato físico.

A identificação de genes por meio da construção da biblioteca subtrativa de *Hydnangium* sp. possibilitará o estudo dos diferentes genes relacionados a micorrização, auxiliando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na associação ectomicorrízica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402, 1997.
- ANINAT, C.; ANDRE, F.; DELAFORGE, M. Oxidative metabolism by P450 and function coupling to efflux systems: modulation of mycotoxin toxicity. *Food Additives and Contaminants* . 22:361-368, 2005.
- BÉGUIRISTAIN, T.; LAPEYRIE, F. Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist* . 136:525–532, 1997.
- BALESTRINI, R.; LANFRANCO, L. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 16:509-524, 2006.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. *In vitro* synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza*. 6:189-196, 1996.
- CAMPOS, D.T.S. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto. 2004. 82p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- CHU-CHOU, M.; GRACE, L.J. Hypogeous fungi associated with some forest trees in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 21:183-190, 1983.
- CULLEN, D. Fungal symbiosis unearthed. *Nature*. 452:42-43, 2008.
- DABOUSSI, M.J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology*. 57: 275-299, 2003.
- DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica*. 100: 253-260, 1997.
- DESCHAMPS, F.; LANGIN, T.; MAURER, P.; GERLINGER, C.; FELENBOK, B.; DABOUSSI, M.J. Specific expression of the *Fusarium* transposon Fot1 and

- effects on target gene transcription. *Molecular Microbiology*. 31:1373-1383, 1999.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93:6025-6030, 1996.
- DITENGOU, F.A.; BÉGUIRISTAIN, T.; LAPEYRIE, F. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. *Planta*. 211:722-728, 2000.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.E.; TAGU, D.; MARTIN, F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 165:599-611, 2005.
- EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETTE, C. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiology Ecology*. 36:61-71, 2001.
- FRETTINGER, P.; DERORY, J.; HERRMANN, S.; PLOMION, C.; LAPEYRIE, F.; OELMÜLLER, R.; MARTIN, F.; BUSCOT, F. Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. *Planta*. 225:331-340, 2007.
- GARCIA-GARRIDO, J.M.; OCAMPO, J.A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 53:1377-1386, 2002.
- GEORGE, H.L.; VANETTEN, H.D. Characterization of pisatin-inducible cytochrome P450s in fungal pathogens of pea that detoxify the pea phytoalexin pisatin. *Fungal Genetics and Biology*. 33:37-48, 2001.
- HELLER, G.; ADOMAS, A.; LI, G.; OSBORNE, J.; VAN ZYL, L.; SEDEROFF, R.; FINLAY, R.D.; STENLID, J.; ASIEGBU, F.O. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biology*. 8:19-32, 2008.
- HIREMATH, S.T.; BALASUBRAMANIAN, S.; ZHENG, J.; PODILA, G.K. Symbiosis-regulated expression of an acetylCoA acetyltransferase gene in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany*. 84:1405-1416, 2006.
- HUA-VAN, A.; DAVIERE, J.M.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABABOUSSI, M.J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Currents Genetics*. 37:339-347, 2000.
- HUA-VAN, A.; HERICOURT, F.; CAPY, P.; DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. Three highly divergent subfamilies of the impala transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular and General Genetics*. 259:354-362, 1998.

HUA-VAN, A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. Evolutionary history of the impala transposon in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Biology and Evolution* 18:1959-1969, 2001.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em 12 de setembro de 2008.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28, 1990.

KAWANO, T.; KAWANO, N.; LAPEYRIE, F. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288:546–551, 2001.

KHAN, R.; TAN, R.; MARISCAL, A.G.; STRANEY, D. A binuclear zinc transcription factor binds the host isoflavonoid-responsive element in a fungal cytochrome p450 gene responsible for detoxification. *Molecular Microbiology*. 49:117-130, 2003.

KIM, S.J.; BERNREUTHER, D.; THUMM, M.; PODILA, G.K. LB-AUT7, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *Journal of Bacteriology*. 181:1963-1967, 1999.

KIM, S.J.; HIREMATH, S.T.; PODILA, G.K. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*. 103:168-172, 1998.

KRÜGER, A.; PESKAN-BERGHÖFER, T.; FRETTEINGER, P.; HERRMANN, S.; BUSCOT, F.; OELMÜLLER, R. Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. *New Phytologist*. 163:149-157, 2004.

LAGRANGE, H.; JAY-ALLEMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*. 149:349-355, 2001.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:251-275, 1997.

LANGIN, T.; CAPY, C.; DABOUSSI, M.J. The transposable element impala, a fungal member of the Tc1-mariner superfamily. *Molecular and General Genetics*. 246:19-28, 1995.

LAURENT, P.; VOIBLET, C.; TAGU, D.; DE CARVALHO, D.; NEHLS, U.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; BAUW, G.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 12:862-871, 1999.

LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. 18:659-673, 2005.



- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use mycorrhizas in temperate and tropical forests. *Symbiosis*. 3:179-206, 1987.
- LÉVY, J.; BRES, C.; GEURTS, R.; CHALHOUB, B.; KULIKOVA, O.; DUC, G.; JOURNET, E.P.; ANE, J.M.; LAUBER, E.; BISSELING, T.L; DÉNARIÉ, J.; ROSENBERG, C.; DEBELLÉ, F. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*. 303:1361-1364, 2004.
- MALAJCZUCK, N.; HARTNEY, V.L. Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camaldulensis* with ectomycorrhizal fungi and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. *Australian Forest Research*. 16:199-206, 1986.
- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*: pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytologist*. 91:467-482, 1982.
- MARSCHNER, H. Nutrient dynamics at the soil-root interface (Rhizosphere). In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J (Ed) *Mycorrhizas in Ecosystems*, C.A.B International, 1992. pp.3-12.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*. 151:145-154, 2001.
- MARTIN, F.; LAPEYRIE, F.; TAGU, D. Altered gene expression during ectomycorrhiza development in mycota. In: LEMKE, P.; CAROLL, G. *Plant relationships*. Berlin: Springer-Verlag. 1997. pp.223-242.
- MARTIN, F.; LAURENT, P.; DE CARVALHO, D.; VOIBLET, C.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; TAGU, D. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genetics and Biology*. 27:161-174, 1999.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59:153-163, 1969.
- MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian journal of Botany*. 65:1927-1939, 1987.
- MEHDY, M.C.; SHARMA, Y.K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N.W. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*. 98:365-374, 1996.
- MELIN, P.; SCHNÜRER, J.; WAGNER, E.G.H. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Molecular Genetics and Genomics*. 267:695-702, 2002
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vitad. and *Tilia americana* L. *Current Genetics*. 46:158-165, 2004.

- MOREL, M.; JACOB, C.; KOHLER, A.; JOHANSSON, T.; MARTIN, F.; CHALOT, M.; BRUN, A. 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, 2005.
- MUELLER, G.M.; HOSAKA, K. Using the *Laccaria-Hydangium* clade as a model to study diversity, biogeographic, and host specificity patterns of macrofungi. *Inoculum*. 59:30, 2008.
- PETER, M.; COURTY, P.E.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; MARTIN, F. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 159:17-129, 2003.
- PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J.; HYMES, M. Molecular interactions in ectomycorrhizas: identification of fungal genes involved in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. *Plant and Soil*. 244:117-128, 2002.
- PRINS, T.W.; WAGEMAKERS, L.; VAN KAN, J.A.L. Structure and expression in planta of *Botrytis cinerea* ubiquitin genes. *European Journal of Plant Pathology*. 106:693-698, 2000.
- ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J.P. Glutaredoxin-dependent peroxidase from poplar. Protein-protein interaction and catalytic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:13609-13614, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANCHEZ, L.; WEIDMANN, S.; ARNOULD, C.; BERNARD, A.R.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. 139:1065-1077, 2005.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74:5463-5467, 1977.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academy Press, 1997. 605p.
- SUNDARAM, S.; KIM, S.J.; SUZUKI, H.; MCQUATTIE, C.J.; HIREMATH, S.T.; PODILA, G.K. Isolation and characterization of a symbiosis regulated *ras* from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:618-628, 2001.
- TAGU, D.; LAPEYRIE, F.; MARTIN, F. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*. 244:97-105, 2002.
- TAGU, D.; NASSE, B.; MARTIN, F. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene*. 168:93-97, 1996.

- TRAPPE, J. M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*. 15:203-222, 1977.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal*. 25:1-12, 2001.
- WHITEFORD, J.R.; SPANU, P.D. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology*. 3:391-400, 2002.
- WOSTEN, H.A.B. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*. 55: 625-646, 2001.
- ZARETSKY, M.; SITRIT, Y.; MILLS, D.; ROTH-BEJERANO, N.; KAGAN-ZUR, V. 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, 2006.
- ZIPCODEZOO. Disponível em: <http://zipcodezoo.com/>. Acesso em 10 de setembro de 2008.

## **CAPÍTULO 2**

### **Transformação de fungos ectomicorrízicos**

## 1. RESUMO

Para estabelecer a transformação do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. duas estratégias foram consideradas: a transformação por PEG/CaCl<sub>2</sub> e mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Para a transformação com PEG/CaCl<sub>2</sub> foi necessário otimizar as condições de obtenção e regeneração de protoplastos. A maior produção de protoplastos de *Hydnangium* sp.,  $1,06 \times 10^7$  protoplastos/mL, foi obtida após duas horas em KCl 0,6 M, na presença de 20 mg/mL da preparação hidrolítica “Lysing Enzymes” e 0,3 g de micélio fúngico com dois dias de idade. Avaliou-se o efeito de diferentes estabilizadores osmóticos no crescimento micelial do fungo. Os meios MNM contendo os estabilizadores KCl e NaCl inibiram totalmente o crescimento de *Hydnangium* sp. Nos meios MNM contendo glicose, inositol, manitol, manitol e sorbitol, sacarose e MgSO<sub>4</sub> foi observado crescimento micelial, mas este foi menor quando comparado ao controle, onde não foi adicionado o estabilizador. Foram testados na regeneração de protoplastos os efeitos de diferentes estabilizadores osmóticos, concentrações de ágar no meio MNM e tempos de incubação da preparação hidrolítica. Entretanto, até o presente momento, não foram estabelecidas as condições que permitissem a regeneração dos protoplastos de *Hydnangium* sp. Para o estabelecimento da transformação

de *Hydnangium* sp. mediada por *A. tumefaciens* foram utilizadas três estirpes de *A. tumefaciens* contendo plasmídeos binários com genes que conferem resistência a higromicina B e glufosinato de amônio e densidades ópticas a 660 nm da cultura de *A. tumefaciens* de 0,15 e 0,4 após o cultivo de 24 horas. Os meios de co-cultivo utilizados tiveram o pH ajustado para 5,2 e 6,2. Foram testados os tempos de cultivo do micélio fúngico de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias, tempos de co-cultivo de 6, 12, 24 e 48 horas e temperaturas de co-cultivo de 22 °C e 28 °C. Apesar de todos os parâmetros avaliados não foi possível a transformação desse fungo. Foi verificado que *Hydnangium* sp. inibe o crescimento de todas as agrobactérias utilizadas. Foi estabelecida a transformação do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, com uma eficiência de transformação de 32,6 %. A integração do gene *hph* no genoma das linhagens transformantes foi confirmada pela detecção de um fragmento de DNA de 690 pb que corresponde ao tamanho esperado. Os transformantes, com cópia única do T-DNA inserida no genoma, serão testados quanto à capacidade de formar micorrizas, visando a seleção de mutantes.

**Palavras chave:** *Hydnangium* sp., *Laccaria laccata*, protoplastos, *Agrobacterium tumefaciens*, transformação, T-DNA, inibição.

## 2. INTRODUÇÃO

Ectomicorrizas são interações biológicas que ocorrem entre plantas terrestres e fungos simbiontes mutualistas. São caracterizadas pela presença do manto de hifas, que cobre a superfície das raízes, a rede de Hartig, e o micélio extramatricial, que se estende a partir do manto para o solo (Smith & Read, 1997). O fungo ectomicorrízico fornece nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo, juntamente com água e elementos-traço do solo para a planta hospedeira. Em contrapartida, o fungo beneficia-se principalmente pelo fornecimento de carbono orgânico pela planta (Smith & Read, 1997).

Alguns compostos de carbono que são transferidos da planta para o fungo hospedeiro são translocados através do micélio fúngico para diferentes componentes do solo, influenciando interações entre outros microrganismos do solo (Finlay & Söderström, 1992). As ectomicorrizas e as hifas associadas formam extensa rede no solo, e, conseqüentemente, promovem grande contribuição para a ciclagem e a absorção de nutrientes nos ecossistemas florestais (Finlay & Söderström, 1992). Além disso, conexões miceliais entre plantas podem facilitar a transferência de compostos de carbono de uma planta a outra, o que irá influenciar no desenvolvimento da comunidade de plantas (Simard & Durall, 2004).

O fungo ectomicorrízico *Hydnangium* é um basidiomiceto pertencente à família Hydnangiaceae. Produz basidiocarpos hipógeos e sub-epígeos. Foram descritas 70 espécies e subespécies do gênero *Hydnangium*, que formam ectomicorrizas especificamente com o *Eucalyptus* (Malajczuk et al., 1982; Index Fungorum, 2008). Foi encontrado na Austrália, Nova Zelândia, Portugal, Espanha, Estados Unidos (Malajczuk et al., 1982; Chu-chou & Grace, 1983; Zipcodezoo, 2008), e, em 2004 houve o primeiro relato deste fungo no Brasil, em plantações comerciais de *E. grandis*, no estado de Minas Gerais. Após o isolamento em meio de cultivo, foi observado crescimento micelial bastante intenso, além da formação de basidiocarpo nessas condições (Campos, 2004).

O fungo ectomicorrízico *Laccaria*, pertencente à família Hydnangiaceae, apresenta 170 espécies já descritas (Index Fungorum, 2008). Tem sido encontrado nos Estados Unidos, Nova Zelândia, Portugal, Espanha, Austrália, Brasil, entre outros países (Giachini et al., 2004; Osmundson et al., 2005; Zipcodezoo, 2008). Foi observada grande abundância deste gênero em plantações de eucaliptos no sul do Brasil, em particular da espécie *Laccaria laccata*, além do relato da ocorrência deste gênero em plantações comerciais de eucaliptos na região sudeste do Brasil (Campos, 2004; Giachini et al. 2004).

*Laccaria bicolor* teve seu genoma seqüenciado, apresentando 65 Mb de tamanho, sendo estimado o conteúdo de 20.000 genes, além de grande número de transposons e seqüências repetidas (Martin et al., 2008). A disponibilidade das seqüências do genoma de *L. bicolor* permitirá a ampliação do conhecimento envolvendo a interação simbiótica entre fungos e plantas no ecossistema (Martin et al., 2008).

A família Hydnangiaceae é composta por fungos pertencentes aos gêneros *Hydnangium* e *Laccaria*. Devido a sua ampla distribuição, grande número de espécies, disponibilidade de isolados cultivados *in vitro* e emprego nos estudos de ectomicorrizas, *Hydnangium* e *Laccaria* representam modelo apropriado para



estudar diversidade, biogeografia e padrão de especificidade de hospedeiros (Mueller & Hosaka, 2008).

Numerosos genes relacionados à simbiose têm sido identificados por meio de bancos de dados de genomas seqüenciados ou de seqüências expressas e análises de expressão diferencial (Voiblet et al., 2001; Podila et al., 2002; Polidori et al., 2002; Peter et al., 2003; Johansson et al., 2004; Menotta et al., 2004; Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005; Zaretsky et al., 2006; Frettinger et al., 2007; Martin et., 2008). No entanto, a comprovação de que estes genes regulados pela simbiose são essenciais à formação da ectomicorriza é ainda necessária (Martin et al., 2008).

Para elucidar os processos envolvidos na formação das ectomicorrizas, é importante a realização de estudos de genômica funcional, com o objetivo de se atribuir funções aos genes relacionados à simbiose. Tais estudos baseiam-se principalmente na obtenção de mutantes incapazes de estabelecer a associação (Combier et al., 2004).

Desde o primeiro relato da transformação de *Saccharomyces cerevisiae*, os protoplastos têm sido utilizados para transformação de fungos filamentosos (Hinnen et al., 1978; Fincham, 1989; Ruiz-Diez, 2002). No entanto, a eficiência de transformação para esses microrganismos é baixa quando comparada à eficiência obtida para *S. cerevisiae*. Desta forma, métodos alternativos de transformação têm sido estabelecidos, a exemplo da eletroporação, da biobalística e do uso de *Agrobacterium tumefaciens* (Ruiz-Diez, 2002; Michielse et al., 2005b). Estes métodos têm sido importantes para fungos que não formam protoplastos em número suficiente ou para aqueles cujos protoplastos não regeneram (MacKenzie et al., 2004).

Comum a todas as técnicas de transformação, é a necessidade de se otimizar a metodologia para cada espécie fúngica e, freqüentemente, somente uma

ou duas metodologias podem ser aplicadas para cada espécie em particular (Meyer et al., 2003).

A transformação por PEG/CaCl<sub>2</sub> baseia-se na entrada de moléculas de DNA nos protoplastos pelo tratamento com CaCl<sub>2</sub> e polietilenoglicol (PEG). O PEG causa a aglomeração dos protoplastos, tornando-os permeáveis ao DNA. Esta técnica tem sido utilizada para transformação de vários fungos basidiomicetos, a saber, *L. laccata* (Barrett et al., 1989), *Hebeloma cylindrosporum* (Marmeisse et al., 1992), *Agaricus bisporus* (Van der Rhee et al., 1996), *Crinipellis pernicioso* (Lima et al., 2003), *Venturia inaequalis* (Fitzgerald et al., 2003) e *Pleurotus nebrodensis* (Lin et al., 2008).

O conhecimento dos fatores que afetam a produção de protoplastos é essencial para o estabelecimento das condições otimizadas de obtenção e regeneração para cada espécie (Kumari & Panda, 1992). Fatores como a idade e a quantidade de micélio, o estabilizador osmótico, a temperatura, o pH, o tempo de digestão e a concentração das enzimas que degradam a parede são citados como determinantes no processo (Chadegani et al., 1989).

Deve-se assegurar, também, a regeneração dos protoplastos, que consiste da reconstituição da parede celular e retorno à forma micelial. A regeneração é verificada pelo aparecimento de colônias a partir dos protoplastos purificados e semeados em meio de cultivo de regeneração. A frequência de regeneração obtida com diferentes fungos varia de 0,1 a 50 %, dependendo, principalmente, da espécie fúngica, da ploidia da célula e do meio de regeneração (Peberdy , 1979; Stasz et al., 1988).

Foram estabelecidas metodologias para obtenção e regeneração de protoplastos de diferentes espécies de basidiomicetos, tais como *Laccaria bicolor* (Kropp & Fortin, 1986); *Rhizoctonia solani* (Hashiba & Yamada, 1982), *Pisolithus tinctorius* (Anunciação et al., 1990); *Suillus granulatus* (Dias et al., 1996), *Pseudozyma flocculosa* (Cheng & Bélanger, 2000), *Lentinus lepideus* (Kim et al.,

2000), *C. pernicioso* (Santos, 2001), *Epulorhiza repens* e *Ceratorhiza* sp. (Coelho et al., 2008). Entretanto, metodologias eficazes para obtenção e regeneração de protoplastos ainda necessitam ser desenvolvidas para várias espécies fúngicas (Abreu, 2001).

A transformação mediada por *A. tumefaciens* baseia-se na transferência de segmento de DNA da agrobactéria para o genoma de determinado organismo, gerando grande número de transformantes com insertos únicos de T-DNA no genoma, o que facilita a análise genética dos transformantes e a identificação das seqüências interrompidas (De Groot et al., 1998; Abuodeh et al., 2000; Mullins et al., 2001). Uma grande vantagem desta técnica é que a transformação pode ser realizada a partir de esporos, micélio, corpos de frutificação e protoplastos (Michielse et al., 2005b).

Este sistema de transferência tem sido adaptado para possibilitar a transferência de DNA *in vitro* para vários basidiomicetos, tais como *Agaricus bisporus* (Chen et al., 2000; Mikosch et al., 2001), *H. cylindrosporium* (Pardo et al., 2002; Combiér et al., 2003), *Paxillus involutus* (Pardo et al., 2002), *Suillus bovinus* (Hanif et al., 2002), *L. bicolor* (Kemppainen et al., 2005), *P. microcarpus* (Pardo et al., 2005), *P. tinctorius* (Rodríguez-Tovar et al., 2005), *S. grevillei* (Murata et al., 2006b) e *Tricholoma matsutake* (Murata et al., 2006a).

Vários fatores podem afetar a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, dentre eles podemos citar a estirpe de *Agrobacterium*, a concentração de acetoseringona, as condições de co-cultivo e a estirpe do fungo (Michielse et al., 2005b).

A disponibilidade das seqüências do genoma de *L. bicolor* e de etiquetas de seqüências expressas (*ESTs* - *expressed sequence tags*), resultantes dos estudos de expressão gênica durante a formação da micorriza, tem permitido a identificação de possíveis genes relacionados à associação. Porém, para avaliação funcional desses genes será necessária a seleção de mutantes obtidos pela mutagenese

inercial em grande escala, visando à comprovação de que esses genes são essenciais para formação da micorriza.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi o estabelecimento de técnicas de transformação para os fungos *Hydnangium* sp. e *Laccaria laccata*, ambos pertencentes à família Hydnangiaceae.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos e condições de cultivo

O isolado D21 do fungo *Hydnangium* sp., isolado de *E. grandis* (Campos, 2004), e o S444 do fungo *Laccaria laccata*, isolado de *Pseudotsuga menziesii*, foram mantidos em meio MNM sólido (Marx, 1969) a 25 °C e repicados periodicamente a cada 20 dias.

Foram utilizadas três estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*: a estirpe LBA4404 (Hoekema et al., 1983), a EHA105 (Hood et al., 1993) e a estirpe AGL-1, cedida por C. Peter Romaine (The Pennsylvania State University), que contém o plasmídeo pBGgHg, cujo T-DNA contém o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) e o gene que confere resistência a higromicina (*hph*), ambos sob o controle do promotor *gpd* de *Agaricus bisporus* (Chen et al., 2000). As estirpes LBA4404 e a EHA105 foram transformadas com o plasmídeo pCAAG3500, que possui no T-DNA o gene *bar*, que codifica a enzima fosfotricina acetiltransferase, sob o controle do promotor do gene *gpd* de *Agaricus bisporus*. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo prof. Augusto Schrank da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As estirpes LBA4404, EHA105 e AGL-1 foram cultivadas durante dois dias, a 28 °C, em placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 50 µg/mL de canamicina e 100 µg/mL de estreptomicina (LBA4404), e com 50 µg/mL de canamicina (EHA105 e AGL-1). As culturas foram estocadas em geladeira, sendo repicada a cada 30 dias.

### **3.2. Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo *Hydnangium* sp.**

Na produção de micélio de *Hydnangium* sp. para os experimentos de obtenção de protoplastos, inoculou-se 5 discos de ágar contendo micélio, retirados das bordas das colônias de placas estoque cultivadas por 10 dias a 28 °C, em placas de Petri contendo 20 mL de meio MNM líquido mantidos a 28 °C, por sete dias. Após o crescimento, o micélio foi fragmentado em liquidificador usando cinco pulsos. Alíquotas de 10 mL da suspensão micelial fragmentada foram transferidas para placas de Petri contendo 10 mL de meio MNM e incubadas a 28 °C por um período de dois dias.

Trezentos miligramas de micélio foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 5 mL de estabilizador osmótico e a preparação hidrolítica “Lysing Enzymes” (Sigma Chemical Co., St Louis, USA - L1412), na concentração de 20 mg/mL. A preparação hidrolítica foi incubada a 30 °C, sob agitação de 80 rpm por uma a 24 horas. A liberação de protoplastos foi acompanhada por observação ao microscópio e foram feitas contagens em câmara de Neubauer. Visando a otimização das condições para obtenção de protoplastos foram realizadas três repetições, avaliando os seguintes parâmetros:

- **Estabilizador osmótico:** Foram testados Manitol, KCl, NaCl e MgSO<sub>4</sub>, na concentração de 0,6 M. Em todos os testes foi utilizado a preparação hidrolítica “Lysing Enzymes” (Sigma Chemical Co., St Louis, USA - L1412).

- **Idade do micélio:** Após a determinação do melhor estabilizador para obtenção de protoplastos, foi testado o tempo de cultivo do micélio fúngico para liberação de protoplastos. O micélio foi crescido por um, dois e três dias.

- **Tempo de incubação:** Após o estabelecimento das melhores condições para obtenção de protoplastos, a liberação de protoplastos foi monitorada por até 48 horas.

O crescimento do fungo *Hydnangium* sp. foi testado em meio MNM contendo glicose, inositol, manitol, sacarose, sorbitol, MgSO<sub>4</sub>, NaCl e KCl na concentração de 0,5 M, e manitol e sorbitol 0,25 M cada. Os estabilizadores que permitiram melhor crescimento micelial foram utilizados nos testes de regeneração de protoplastos.

Após o período de digestão, a preparação hidrolítica foi passada por uma gaze colocada no interior de uma seringa para retenção dos fragmentos de hifas. O filtrado, contendo a preparação hidrolítica com os protoplastos, foi centrifugado a 710 g por 10 min, para sedimentação dos protoplastos. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de estabilizador osmótico, novamente centrifugado e ressuspenso em 1 mL de estabilizador. Nova contagem dos protoplastos foi feita em câmara de Neubauer.

A suspensão de protoplastos foi adicionada ao meio MNM líquido, sólido e semi-sólido com diferentes estabilizadores osmóticos. As placas permaneceram incubadas a 25 °C até o surgimento e desenvolvimento das colônias.

### **3.3. Transformação de fungos ectomicorrízicos mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

#### **3.3.1. Teste de resistência a agentes seletivos**

Os fungos *Hydnangium* sp. e *L. laccata* foram testados quanto à resistência ao glufosinato de amônio (Finale – Bayer) e à higromicina B (Sigma Chemical Co., St Louis, USA).

Para o fungo *Hydnangium* sp., no teste de resistência a higromicina B, foram utilizadas as concentrações de 40, 60, 80 e 100 µg/mL, e no teste de resistência ao glufosinato de amônio, as concentrações de 40, 80, 120, 160 e 200 µg/mL. Para o fungo *L. laccata* nos testes de resistência ao glufosinato de amônio e higromicina B foram utilizadas as concentrações de 40, 80, 120 e 160 µg/mL. Um controle positivo, onde não foi acrescentado o agente de seleção, foi adicionado em cada teste.

Para realização do teste, discos de ágar de 9 mm de diâmetro com micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio MNM sólido suplementado com diferentes concentrações de glufosinato de amônio ou de higromicina B. Foram realizadas três repetições para cada concentração. As placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias, sendo analisado o crescimento micelial, para determinar a concentração mínima de glufosinato de amônio ou de higromicina B que inibe o crescimento dos fungos avaliados.

### **3.3.2. Transformação do fungo *Hydnangium* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Os experimentos de transformação foram realizados segundo Pardo et al. (2002) e Kemppainen et al. (2005) com modificações.

O fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. foi cultivado por diferentes dias a 28 °C, em placas de Petri contendo papel celofane sob o meio MNM sólido.

A estirpe hipervirulenta de *A. tumefaciens* foi inoculada em 20 mL de LB líquido acrescido do antibiótico adequado e cultivada na temperatura de 30 °C, por 24 horas com agitação de 180 rpm. Após este período, a cultura foi diluída em 20 mL de meio de indução líquido, acrescido de 200 µM de acetoseringona até a densidade óptica a 660 nm de 0,15 ou 0,4. A cultura foi mantida na temperatura de



30 °C com agitação de 180 rpm até que a DO<sub>660</sub> estivesse entre 0,4 e 0,5 por um período adicional de 4 h.

A folha de papel celofane, contendo os discos de ágar com micélio, foi transferida para o meio de indução sólido acrescido de 200 µM de acetoseringona. Sobre cada disco de ágar contendo micélio, foi adicionado 50 µL da solução com *A. tumefaciens*, seguido de incubação no escuro. Após esse período, as folhas de celofane foram transferidas para placa de Petri contendo meio MNM sólido, acrescido do agente de seleção e 200 µg/mL de cefotaxime. As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C até o aparecimento dos possíveis transformantes.

Para a realização da transformação mediada por *A. tumefaciens* foram testados parâmetros como as estipes de *A. tumefaciens* LBA4404, AGL-1 e EHA105, densidade óptica a 660 nm da cultura de *Agrobacterium* de 0,15 e 0,4 após o crescimento por 24 horas, meios de co-cultivo com pH ajustado para 5,2 e 6,2, idade do micélio de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias de cultivo, tempo de co-cultivo de 6, 12, 24 e 48 horas e temperatura de co-cultivo de 22 °C e 28 °C.

### **3.3.3. Confirmação da presença dos genes *bar* e *vir* nos plasmídeos das estirpes de *Agrobacterium tumefaciens***

O DNA plasmidial foi extraído segundo o protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989).

Para detectar o gene *bar* foi utilizado a técnica de PCR, utilizando os oligonucleotídeos PATJV1 (5'- CAGGAACCGCAGGAGTGGA - 3') e PATJV2 (5' - CCAGAAACCCACGTCATGCC - 3') (White et al., 1990). Para reação de amplificação foram utilizados: 10 ng de DNA total, 2 µM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, Tampão IB 1 X e 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil). As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos

consistindo cada de 1 min at 94 °C, 1 min at 67 °C e 1 min a 72 °C. Um passo final de alongação consistindo de 5 min a 72 °C foi incluído (Vickers et al., 1996).

Para detecção do gene *vir* foi utilizado os oligonucleotídeos A (5' ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT 3') e E' (5' CCT GAC CCA AAC ATC TCG GCT GCC CA 3'), que anelam em uma seqüência conservada do gene *virD2*. Para reação de amplificação foram utilizados: 10 ng de DNA total, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, Tampão IB 1 X e 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil). As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial de 1 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos consistindo cada de 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C e 1 min a 72 °C. Um passo final de alongação consistindo de 5 min a 72 °C foi incluído (Haas et al., 1995).

#### **3.3.4. Teste de inibição do crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* e *Escherichia coli* por *Hydnangium* sp.**

Para este procedimento foram utilizadas a linhagem de *Escherichia coli*  $\alpha$  hemólise, gentilmente cedida pela empresa de Microbiologia Veterinária Especial (Microvet), e as estirpes de *A. tumefaciens*: EHA105, AGL-1 e LBA4404.

As bactérias foram inoculadas em 20 mL de LB líquido acrescido do respectivo antibiótico e mantidas na temperatura de 30 °C, exceto a *E. coli* que foi mantida a 37 °C, com agitação de 180 rpm por 24 h.

Um disco de ágar contendo micélio de *Hydnangium* sp., cultivado por dois dias, foi colocado em um orifício no meio MNM sólido, que continha 200 µL do meio de cultivo com a linhagem bacteriana, plaqueada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Após 24 h de incubação a 28 °C, foi avaliado o aparecimento do halo de inibição do crescimento das linhagens ao redor do disco contendo micélio.

### **3.3.5. Transformação do fungo *Laccaria laccata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

O experimento de transformação foi realizado segundo o protocolo descrito por Kemppainen et al. (2005) com modificações. O fungo micorrízico *L. laccata* foi cultivado por três dias a 28 °C, em placas de Petri contendo papel celofane sob o meio MNM sólido. A estirpe hipervirulenta de *A. tumefaciens* AGL-1, que contém o plasmídeo pBGgHg, foi inoculada em 20 mL de LB líquido acrescido de 50 µg/mL de canamicina e cultivada na temperatura de 30 °C, por 24 h com agitação de 180 rpm. Após este período, a cultura foi diluída em 20 mL de meio de indução acrescido de 200 µM de acetoseringona até a densidade ótica a 660 nm de 0,15 (Bundock et al., 1995). A cultura foi mantida na temperatura de 30 °C e agitação de 180 rpm até que a DO<sub>660</sub> estivesse entre 0,4 e 0,5.

A folha de papel celofane, contendo os discos de ágar com micélio, foi transferida para o meio de indução sólido acrescido de 200 µM de acetoseringona. Sobre cada disco de ágar contendo micélio foi adicionado 20 µL do meio de cultivo com *A. tumefaciens*. As placas foram incubadas no escuro a 22 °C por 5 dias. Após esse período, as membranas de celofane foram transferidas para outra placa de Petri contendo meio MNM sólido, acrescido de 80 µg/mL de higromicina e 200 µg/mL de cefotaxime. As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C até o aparecimento dos possíveis transformantes.

### **3.3.6. Estabilidade mitótica**

Para avaliar se o T-DNA integrou no genoma dos fungos transformados de forma estável, todos os transformantes foram repicados 5 vezes no meio MNM sólido e depois foram transferidos para o meio MNM sólido contendo 80 µg/mL higromicina B. A estabilidade mitótica foi avaliada pela manutenção da resistência das linhagens transformantes dos fungos a higromicina B, mesmo depois das passagens pelo meio sem higromicina B.

### 3.3.7. Análise dos transformantes

O DNA total das linhagens transformantes e da selvagem foi extraído segundo a técnica descrita por Schäfer & Wöstemeyer (1992), com modificações.

Para detecção da presença do gene *hph* que confere resistência a higromicina B, o DNA total foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos, HPH1 5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3' e HPH2 5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'. A reação de amplificação consistiu de 10 ng de DNA total, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado, Tampão IB 1 X e 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil). As condições de amplificação incluem um passo de desnaturação inicial de 2 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos consistindo cada de 45 s a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min a 72 °C. Um passo final de elongação consistindo de 5 min a 72 °C foi incluído.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo *Hydnangium sp.*

O efeito de diferentes estabilizadores osmóticos sobre o crescimento micelial do fungo *Hydnangium sp.* foi avaliado neste estudo (Figura 1). Os meios MNM contendo os estabilizadores KCl e NaCl inibiram o crescimento de *Hydnangium sp.* Nos meios MNM contendo glicose, inositol, manitol, manitol e sorbitol, sacarose e  $MgSO_4$  foi observado crescimento micelial em menor intensidade quando comparado ao controle, sem a presença de estabilizador (Figura 1).

O estabilizador osmótico empregado na regeneração dos protoplastos influencia a frequência de regeneração, podendo impedir a ocorrência do processo. O efeito do estabilizador varia de espécie a espécie fúngica, sendo que altas concentrações de açúcar ou sal podem afetar o metabolismo celular (Solís et al., 1996; Kim et al., 2000). Para *Suillus granulatus* a sacarose, KCl e  $MgSO_4$  propiciaram melhor crescimento micelial, podendo ser utilizados nos processos de obtenção e regeneração de protoplastos, além de proporcionar estabilidade osmótica, estes estabilizadores não causaram outras alterações prejudiciais no metabolismo celular desse fungo (Dias et al., 1996).

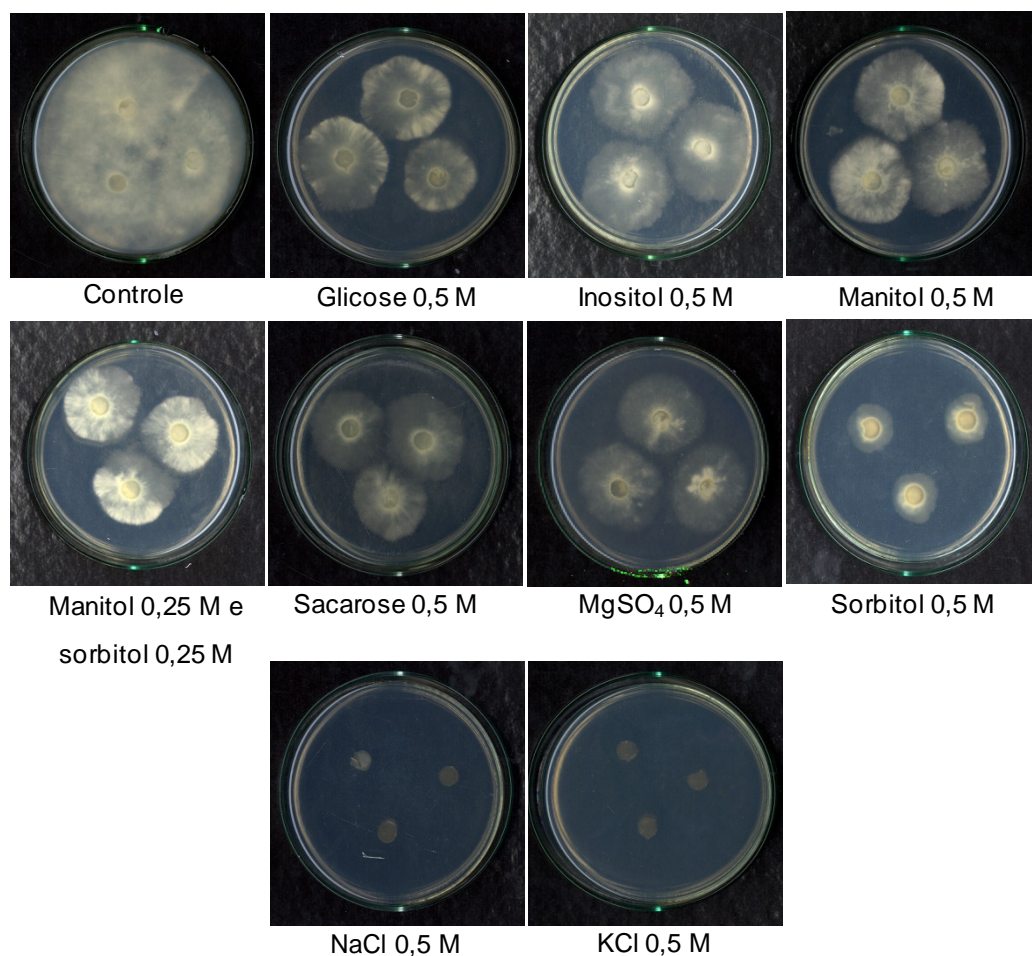


Figura 1. Crescimento micelial de *Hydnangium* sp. cultivado em meio MNM com diferentes estabilizadores osmóticos após 15 dias a 28 °C.

Uma vez determinado quais os estabilizadores que menos interferem no crescimento do fungo *Hydnangium* sp., estes foram utilizados posteriormente nos experimentos de regeneração dos protoplastos.

Os estabilizadores osmóticos NaCl 0,6 M, KCl 0,6 M, MgSO<sub>4</sub> 0,6 M e manitol 0,6 M, testados para obtenção de protoplastos, propiciaram a produção de protoplastos do fungo *Hydnangium* sp.. Assim, KCl 0,6 M foi selecionado para ser utilizado nos testes posteriores por promover maior liberação de protoplastos em relação aos outros estabilizadores testados (Tabela 1). O estabilizador osmótico é componente importante do sistema lítico, pois a digestão enzimática da parede celular do fungo deve ser realizada em meio adequado que irá permitir a

manutenção da integridade dos protoplastos obtidos (Peberdy, 1991; Kim et al., 2000).

Tanto a aplicação de açúcares quanto de sais como estabilizadores osmóticos têm dado bons resultados na obtenção de protoplastos em fungos filamentosos (De Vries & Wessels, 1973; Yanagi & Takebe, 1984; Staz et al., 1988; Hébraud & Fèvre, 1988; Cheng & Bélanger, 2000). Para fungos ectomicorrízicos, como *S. granulatus*, o  $MgSO_4$  têm sido relatado como um bom estabilizador (Hébraud & Fèvre, 1988; Dias et al., 1996). No presente trabalho, os melhores resultados foram obtidos com KCl 0,6 M e está de acordo com os resultados obtidos por Santos (2001) e Coelho et al. (2008) quando trabalharam com os fungos *Crinipellis pernicioso* e *Epulorhiza repens*, respectivamente.

O tempo de cultivo do micélio mais adequado para liberação de protoplastos de *Hydnangium* sp. foi de dois dias (Tabela 2). A idade do micélio é considerada um dos fatores mais importantes na liberação de protoplastos, por estar relacionada à mudanças na composição e estrutura da parede celular (Peberdy et al., 1976). Fungos de crescimento muito rápido apresentam micélio mais susceptível à degradação da parede celular, permitindo maior liberação de protoplastos com menos de 24 h de crescimento, enquanto fungos com crescimento mais lento necessitam de um ou vários dias de crescimento do micélio para a obtenção desses protoplastos (Hashiba & Yamada, 1982; Chadegani et al., 1989).

Outro fator testado foi o tempo de incubação com a preparação hidrolítica, uma vez que tempos prolongados de contato com a enzima podem levar ao rompimento dos primeiros protoplastos formados, além da ação nas proteínas da membrana plasmática comprometendo o processo de regeneração (Solís et al., 1996; Kim et al., 2000).

Tabela 1. Produção de protoplastos de *Hydnangium* sp. em meio com diferentes estabilizadores osmóticos, após 5 horas de tratamento com a preparação hidrolítica\*

Estabilizadores	Protoplastos/mL			Média
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
NaCl 0,6 M	$4,55 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$9,40 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
KCl 0,6 M	$8,0 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$1,18 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$
MgSO <sub>4</sub> 0,6 M	$2,1 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	$4,55 \times 10^6$
Manitol 0,6 M	$6,4 \times 10^6$	$4,35 \times 10^6$	$4,65 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$

\*Em todos os testes foi utilizada a enzima "Lysing Enzymes" (20 mg/mL).

Tabela 2. Produção de protoplastos de *Hydnangium* sp. a partir de micélio com diferentes tempos de cultivo, após 5 horas de tratamento com a preparação hidrolítica\*

Tempo de cultivo	Protoplastos/mL			Média
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	
1 dia	$6,40 \times 10^6$	$6,70 \times 10^6$	$6,75 \times 10^6$	$6,61 \times 10^6$
2 dias	$2,63 \times 10^7$	$1,09 \times 10^7$	$8,15 \times 10^6$	$1,51 \times 10^7$
3 dias	$2,65 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$

\*Em todos os testes foram utilizados a enzima "Lysing Enzymes" (20 mg/mL) e o estabilizador KCl 0,6 M.

A máxima liberação de protoplastos ocorreu após 2 horas de incubação, o que evidencia que a parede celular do fungo *Hydnangium* sp. é muito susceptível à ação da preparação hidrolítica (Figura 2). Após este período foi observada a queda no número de protoplastos. Tratamentos prolongados, excedendo 24 horas diminuíram a formação de protoplastos. A incubação prolongada da preparação hidrolítica tem sido relacionada à lise de protoplastos (Chadegani et al., 1989; Solís et al., 1996; Kim et al., 2000).



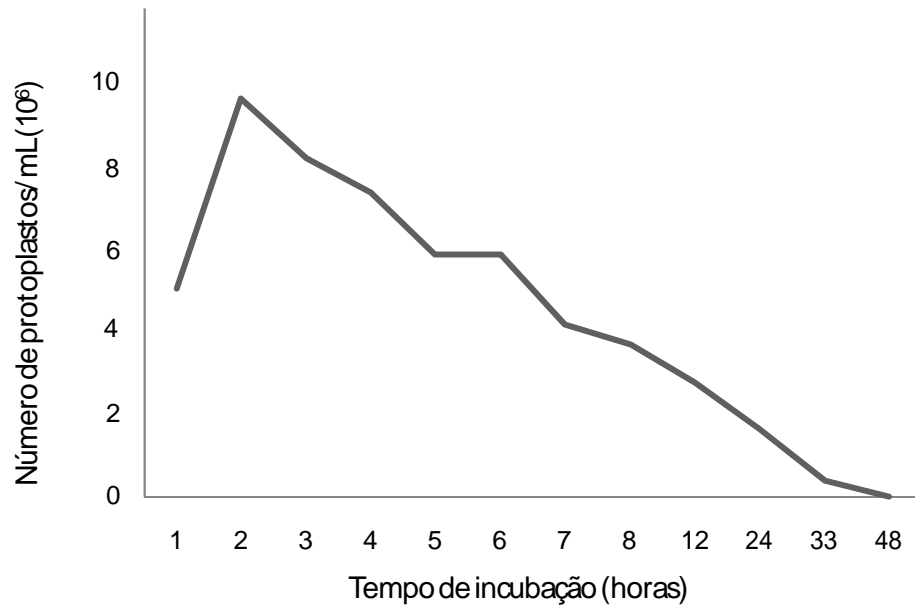


Figura 2. Número de protoplastos de *Hydnangium* sp. produzido ao longo do tempo de incubação do micélio com 2 dias de idade, na presença de KCl 0,6 M e da preparação hidrolítica “Lysing enzymes”.

Após o estabelecimento das melhores condições para obtenção de protoplastos e dos estabilizadores que permitiram melhor crescimento do fungo *Hydnangium* sp., foram realizados os testes para regeneração dos protoplastos.

Nos experimentos de regeneração de protoplastos foram utilizados os diferentes estabilizadores osmóticos que permitiram o crescimento do fungo, meio MNM líquido, sólido e semi-sólido e diferentes tempos de incubação da preparação hidrolítica, como 30 minutos, uma e duas horas. Entretanto, até o presente momento, não foram estabelecidas as condições otimizadas que permitissem a regeneração dos protoplastos de *Hydnangium* sp..

Vários fatores podem influenciar regeneração dos protoplastos, como o estabilizador osmótico, a presença de protoplastos sem núcleos ou outras organelas, aglomeração de protoplastos depois da centrifugação e tempo de exposição da parede celular a ação das enzimas líticas (Deed & Seviour, 1989; Pederdy, 1991; Solís et al., 1996; Kim et al., 2000).

Um fator que influencia a regeneração de protoplastos é a concentração do meio de regeneração (Shirahama et al., 1981). Um ponto importante que deve ser notado quando se utiliza a técnica de “pour plate” é o resfriamento do meio o suficiente para não danificar os protoplastos (Shirahama et al., 1981).

Outro fator testado foi o tempo de incubação dos protoplastos, uma vez que tempos prolongados de contato com a preparação hidrolítica podem levar ao rompimento dos primeiros protoplastos formados, além da alteração de proteínas da membrana plasmática comprometendo o processo de regeneração (Solís et al., 1996; Kim et al., 2000).

Uma vez que foram utilizados estabilizadores que previamente foram testados e não inibiram completamente o crescimento do micélio de *Hydnangium* sp., foram testados menores tempos de exposição da parede celular à ação das preparações hidrolíticas e foram utilizados o meio de cultivo tanto sólido, semi-sólido, quanto líquido, sugerimos que a não regeneração desses protoplastos pode ser devido ao grande número de protoplastos anucleados. Para avaliar a presença de núcleos nos protoplastos, foi feita a coloração com SYBR Green I, porém não foi observado núcleo nos protoplastos obtidos, sendo a explicação para o insucesso da regeneração.

#### **4.2. Transformação do fungo *Hydnangium* sp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Uma vez que não foi possível definir as condições para regeneração dos protoplastos, o que iria comprometer sua utilização em experimentos de transformação, outra estratégia para transformação seria a utilização de *A. tumefaciens*.

O fungo *Hydnangium* sp. foi testado quanto a sensibilidade a higromicina B e glufosinato de amônio. O fungo *Hydnangium* sp. mostrou-se resistente à higromicina B até a concentração máxima testada, 100 µg/mL (Figura 3). A

concentração de 40 µg/mL de glufosinato de amônio inibiu completamente o crescimento micelial do fungo *Hydnangium* sp. (Figura 4).

A higromicina é o agente de seleção mais utilizado nos experimentos de transformação de fungos filamentosos, porém, alguns fungos têm-se mostrado resistentes a este agente. Para o fungo *Beauveria bassiana*, a germinação dos esporos foi observada até a concentração de 2 mg/mL de higromicina B. Desta forma, agentes de seleção alternativos têm sido utilizados, como o fungicida benomil, os antibióticos fleomicina e bleomicina, e o herbicida glufosinato de amônio (Sun et al., 2002; Fang et al., 2004; Pardo et al., 2005; Duarte et al., 2007). No caso de *B. bassiana*, que mostrou resistência a higromicina, a transformação foi realizada utilizando como agente de seleção o glufosinato de amônio, onde foi observado que, com 30 µg/mL a germinação dos conídios foi completamente inibida (Fang et al., 2004).

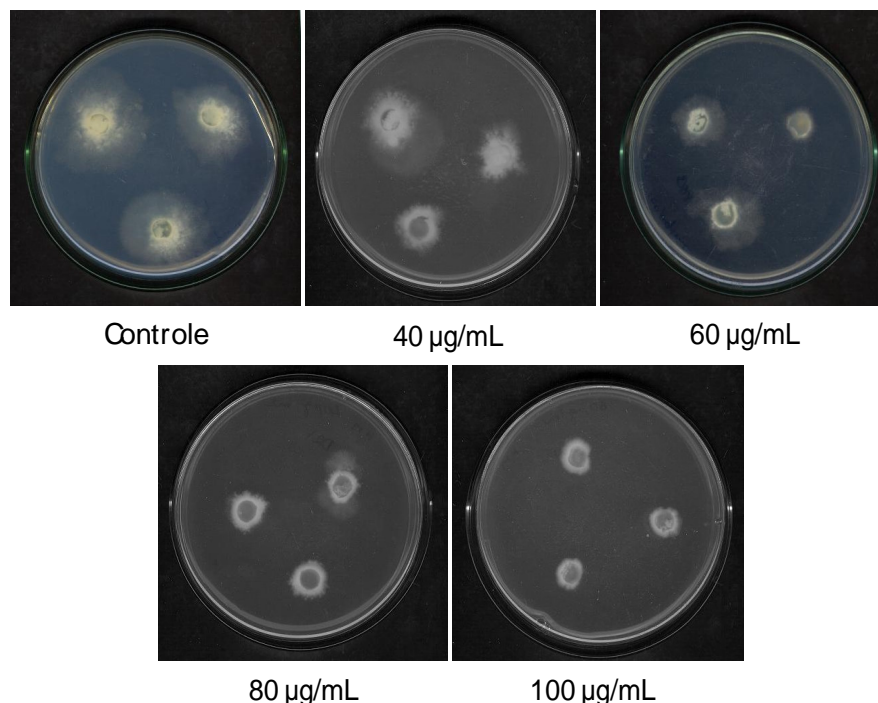


Figura 3. Crescimento micelial de *Hydnangium* sp. em meio MNM com diferentes concentrações de higromicina B após 20 dias de incubação a 28 °C.

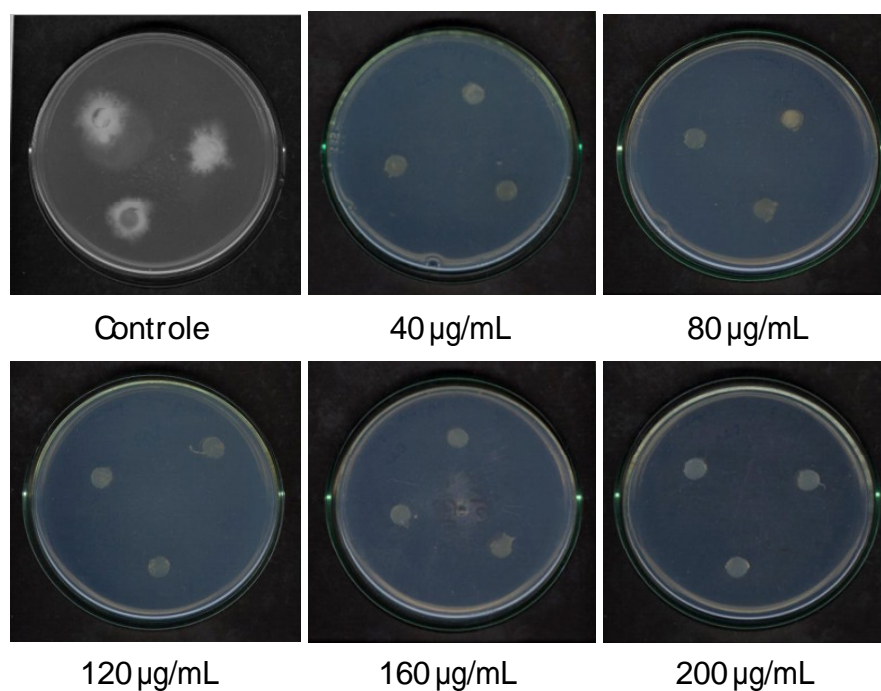


Figura 4. Crescimento micelial de *Hydnangium* sp. em meio MNM com diferentes concentrações de glufosinato de amônio após 20 dias de incubação a 28 °C.

Para transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* vários fatores devem ser considerados, como a estirpe de *Agrobacterium* utilizada e as condições de cultivo, o meio e as condições de co-cultivo, além do inóculo inicial fúngico utilizado, como hifas, esporos ou esporocarpos (Michielse et al., 2005b).

Apesar de vários parâmetros considerados críticos para transformação como, diferentes estirpes e densidades ópticas a 660 nm da cultura de *A. tumefaciens*, meios de co-cultivo com pH ajustado para 5,2 e 6,2, tempos de cultivo do micélio fúngico de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias, tempos de co-cultivo, 6, 12, 24 e 48 horas, e as temperaturas de co-cultivo de 22 °C e 28 °C serem testados, não foi possível estabelecer a transformação para o fungo *Hydnangium* sp.

Vários estudos têm mostrado que para cada fungo existe uma combinação ótima de tempo e temperatura de co-cultivo para obter o número máximo de transformantes (Combiér et al., 2003; Michielse et al., 2005b). A temperatura de co-

cultivo também pode influenciar a eficiência de transformação e tem sido observado que as temperaturas ótimas para a transferência do T-DNA variam de 22 °C e 25 °C (Combiar et al., 2003; Rolland et al., 2003; Michielse et al., 2003; Kemppainen et al., 2005; Murata et al., 2006a). Isso está de acordo com a agrotransformação em plantas, em que temperatura de 20 °C a 28 °C são consideradas ótimas (Dillen et al., 2002; Salas et al., 2002). Tem sido sugerido que temperaturas altas afetam a maquinaria de transferência do T-DNA (Fullner & Nester, 1996).

O efeito do pH durante o co-cultivo foi testado para *Colletotrichum trifolii* e *C. lagenarium* e foi observado que o pH ótimo foi entre 5,0 e 5,3 (Tsuji et al. 2003; Takahara et al. 2004).

A transformação mediada por *A. tumefaciens* pode ser utilizada para transformar esporos, hifas, protoplastos e esporocarpos. Entretanto, para o fungo zigomiceto *Rhizopus oryzae*, houve a produção de transformantes somente quando protoplastos foram transformados. Nenhum transformante foi obtido quando esporos e esporos germinados foram utilizados (Michielse et al., 2004). Outro fator que influencia a eficiência de transformação é o tempo de cultivo do micélio fúngico. A utilização de micélio de 15 dias de cultivo de *Blastomyces dermatitidis* permitiu a obtenção de transformantes com baixa eficiência (Sullivan et al., 2002)

Apesar da transformação mediada por *A. tumefaciens* promover alta porcentagem de transformantes para alguns fungos, existem vários casos descritos na literatura em que não houve êxito na transformação. Rolland e colaboradores (2003) não conseguiram transformar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, mesmo depois de testar vários parâmetros. Para *Aspergillus niger* a eficiência de transformação foi muito baixa e não foi reprodutível (Michielse et al., 2005a).

Como mencionado, a não obtenção de transformantes pode ser influenciada por diferentes fatores, entre eles a ausência de um ou dois plasmídeos do sistema binário, em que um contém o gene *bar* e outro contém os genes *vir*, na estirpe de *A. tumefaciens* utilizada nos experimentos de transformação. Como não obtivemos

sucessos nos experimentos de transformação para *Hydnangium* sp. a presença dos plasmídeos nas linhagens de *A. tumefaciens* foi avaliada.

O gene *bar* que codifica fosfotricina acetil transferase, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, foi amplificado com os oligonucleotídeos PATJV1 e PATJV2 (White et al., 1990). O padrão eletroforético mostrou um fragmento de DNA de aproximadamente 372 pb indicando a presença do plasmídeo PCAAG 3500, que contém o gene *bar* (Figura 5).

Para verificar se os genes de virulência estavam presentes no plasmídeo, foram utilizados os oligonucleotídeos VIRD2A e VIRD2E para amplificar o gene *virD2* de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o plasmídeo PCAAG 3500 (Haas et al., 1995). O padrão eletroforético revelou a presença de um fragmento de DNA de aproximadamente 338 pb que corresponde ao gene *virD2*. (Figura 6).

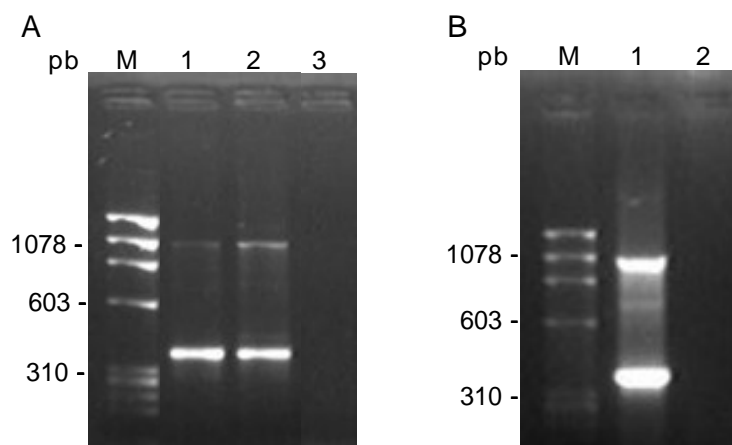


Figura 5. Detecção do gene *bar* presente no plasmídeo pCAAG3500 em estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*. As reações de amplificação foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos PATJV1 e PATJV2. (A) 1-2: estirpes LBA4404 transformadas; 3: controle negativo. (B) 1: estirpe EHA105 transformada; 2: controle negativo. M: Marcador  $\phi$  X174/*HaeIII*.

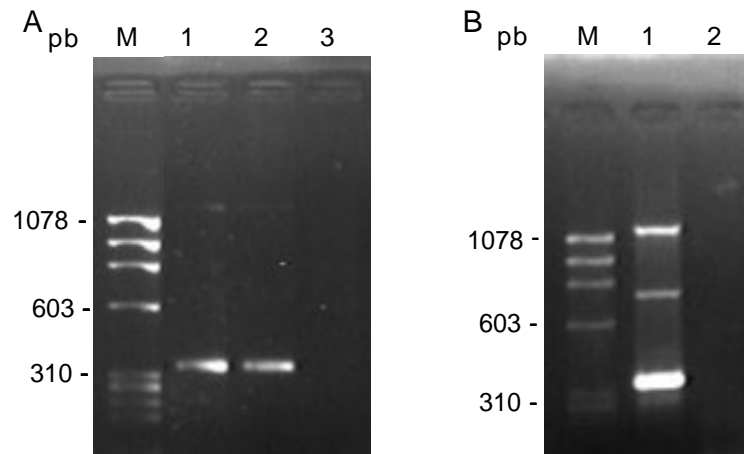


Figura 6. Detecção do gene *vir* presente no plasmídeo pCAAG3500 em estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*. As amplificações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos VIRD2A e VIRD2E. (A) 1-2: estirpes LBA4404 transformadas; 3: controle negativo. (B) 1: estirpe EHA105 transformada; 2: controle negativo. M: Marcador  $\phi$  X174/*HaeIII*.

Uma vez que foi detectada a presença do gene *vir* e *bar* nas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* outros fatores devem estar atuando para o insucesso da transformação.

Foi observada nas placas de co-cultivo da *Agrobacterium* com o fungo *Hydnangium* sp. a ausência de crescimento da bactéria ao redor dos discos de ágar contendo micélio (Figura 7). A formação do halo de inibição em torno dos discos de ágar contendo o micélio, indica que o fungo *Hydnangium* sp. esteja produzindo compostos que inibam o crescimento da agrobactéria, impossibilitando a transformação deste fungo.

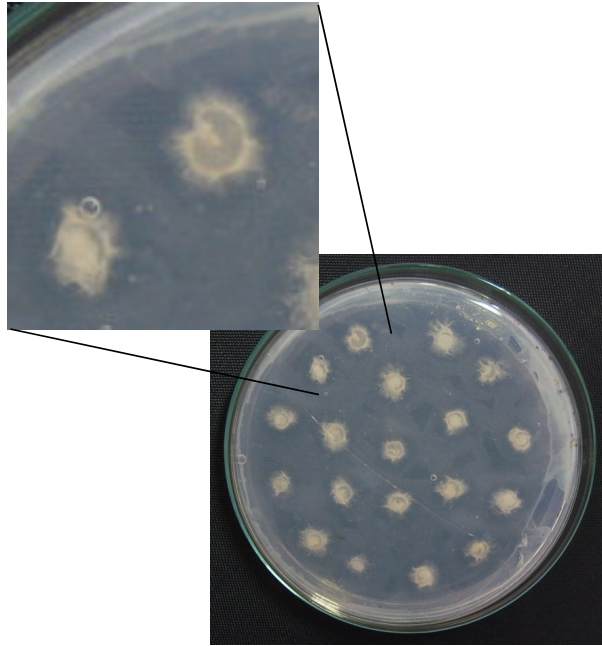


Figura 7. Inibição do crescimento da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* pelo fungo *Hydnangium* sp. Discos de ágar contendo micélio do fungo *Hydnangium* sp e *A. tumefaciens* LBA4404, que contém o plasmídeo pCAAG3500, no meio de co-cultivo contendo meio de indução acrescido de 200  $\mu$ M acetoseringona após 5 dias de incubação a 22 °C.

Uma vez observada a inibição da estirpe de *A. tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pCAAG3500 por *Hydnangium* sp., foi avaliado se o fungo inibiria outras estirpes de agrobactérias e uma estirpe de *E. coli* a hemólise que também é gram-negativa. Foi observado halo de inibição do crescimento de todas as estirpes de agrobactérias testadas, porém *Hydnangium* sp. não inibiu o crescimento da estirpe de *E. coli* (Figura 8).

Tem sido relatada a produção de antibióticos por diferentes fungos basidiomicetos em cultura pura (Trappe, 1962; Anke, 1989; Maziero et al., 1999; Rosa et al., 2003; Ezeronye et al., 2005; Smânia et al., 1995, Hasegawa et al., 2005; Vaidya et al., 2005). Vários compostos que inibem o crescimento de bactérias, actinomicetos, fungos saprofíticos e fitopatogênicos tem sido isolados de Basidiomicetos (Anke, 1989, 1995, Sidorova & Velikanov, 2000; Rosa et al., 2003).



Dois fungos ectomicorrízicos, *Pisolithus* sp. e *Scleroderma* sp., foram avaliados quanto a capacidade de inibição do crescimento de diferentes espécies de bactérias e de fungos patogênicos de plantas. Foi observado que os fungos tiveram maior atividade antimicrobiana contra *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *A. tumefaciens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* e *E. coli* (Vaidya et al., 2005).

Desta forma, a utilização de fungos ectomicorrízicos, além de apresentar o papel como fungo simbiótico em associação com diferentes espécies de árvores podem ser utilizados na produção de diferentes antimicrobianos.

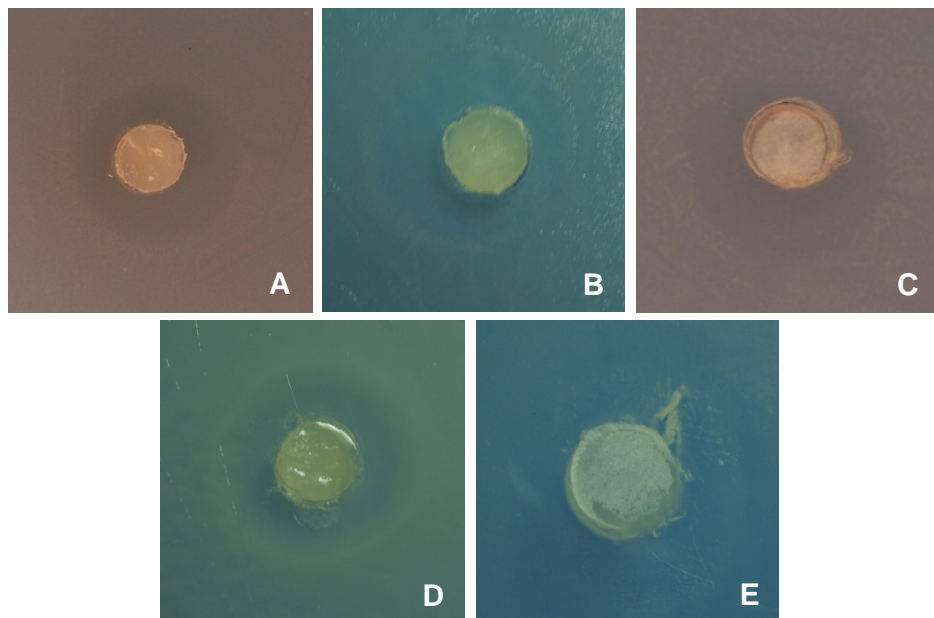


Figura 8. Inibição do crescimento das estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* (A-D) e *Escherichia coli* a hemólise por *Hydnangium* sp. em meio MNM contendo discos de ágar com micélio do fungo *Hydnangium* sp. e 200  $\mu$ L da cultura bacteriana, após um dia de incubação a 28 °C (*A. tumefaciens*) e 37 °C (*E. coli*). *A. tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pCAAG3500 (A), LBA4404 contendo o plasmídeo pBANFbar (B), AGL-1 contendo o plasmídeo pBGgHg (C) EHA105 (D) e *E. coli* a hemólise (E).

#### 4.3. Transformação do fungo *Laccaria laccata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O fungo *L. laccata* mostrou-se resistente à higromicina B até a concentração de 40 µg/mL (Figura 9). A concentração de 40 µg/mL de glufosinato de amônio inibiu completamente o crescimento micelial do fungo *Laccaria laccata* (Figura 10).

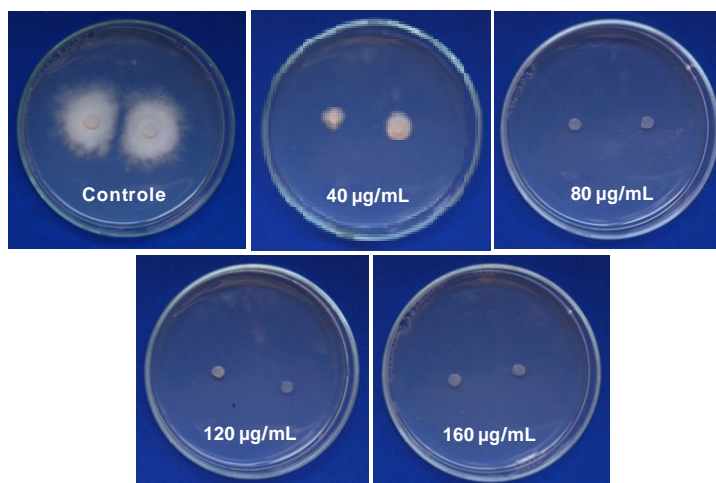


Figura 9. Crescimento micelial de *Laccaria laccata* em meio MNM com diferentes concentrações de higromicina B após 30 dias de incubação à 28 °C.

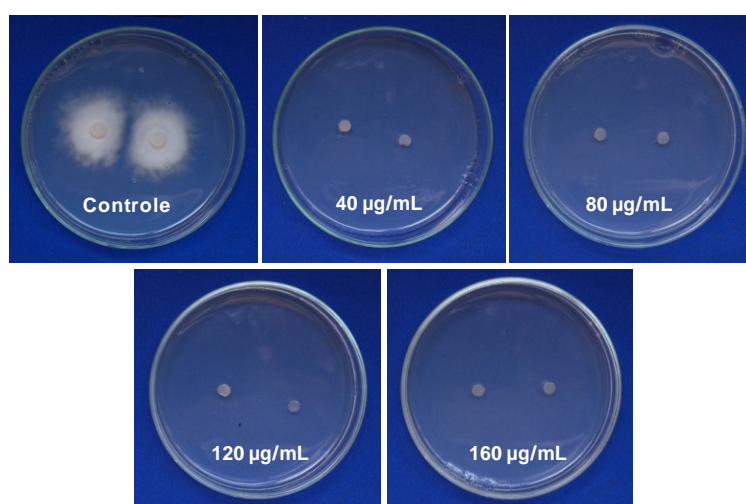


Figura 10. Crescimento micelial de *Laccaria laccata* em meio MNM com diferentes concentrações de glufosinato de amônio após 30 dias de incubação à 28 °C.

*Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pBGgHg foi co-cultivada com o micélio do fungo ectomicorrízico *L. laccata*. Foram realizados três experimentos de forma independente e foi observado variação no número de transformantes obtidos entre os experimentos (Tabela 3). Em média a eficiência de transformação foi de 32,6 %.

Tabela 3. Eficiência de transformação do fungo *Laccaria laccata* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Experimento	Nº de transformantes	Nº de discos de micélio	Eficiência da transformação*
1	4	130	3
2	48	133	36
3	39	66	59

\*Eficiência da transformação (%) =  $\frac{100 \times \text{nº de transformantes}}{\text{nº de discos de micélio}}$

A eficiência de transformação para outros fungos basidiomicetos ectomicorrízicos foi de 30 % para *P. microcarpus* (Pardo et al., 2005), entre 10 e 50 % para *L. bicolor* (Kemppainen et al., 2005) e 66 % para *S. bovinus* (Hanif et al., 2002).

Para confirmar a integração do gene *hph* no genoma das linhagens transformantes, o DNA total foi extraído e amplificado utilizando os oligonucleotídeos HP1 e HPH2, sendo detectado um fragmento de DNA de 690 pb que corresponde ao tamanho esperado (Figura 11).

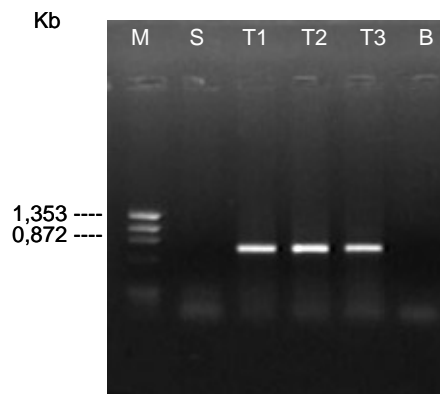


Figura 11. Detecção da integração do gene *hph*. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *hph* dos transformantes de *Laccaria laccata*. M: Marcador  $\phi$ X174/*Hae*III, S: Isolado selvagem de *Laccaria laccata* (S444), T1, T2 e T3: Transformantes de *Laccaria laccata*, B: Controle negativo.

Os transformantes foram cultivados em meio MNM acrescido de 80 ug/mL de higromicina e transferidos por 5 vezes em meio MNM sem higromicina B. Após este período foram novamente repicados no meio contendo higromicina e foi observada a manutenção da resistência, demonstrando que o T-DNA integrou no genoma dos fungos transformados de forma estável.

Após o estabelecimento do protocolo de transformação, o próximo passo é o isolamento de mutantes, identificando entre os transformantes, aqueles que possuem cópias únicas do T-DNA inserido no genoma. Estes transformantes serão testados quanto à capacidade de formar micorrizas, utilizando a técnica de micorrização *in vitro*. A etapa seguinte será a avaliação das linhagens transformantes mutantes recuperando e caracterizando as seqüências de DNA interrompidas.

Apesar do estabelecimento de transformação para diferentes fungos micorrízicos, existem poucos estudos funcionais de mutantes incapazes de formarem micorrizas. Em *H. cylindrosporum* foram avaliados mutantes que foram

incapazes de formarem micorrizas, sugerindo que estes mutantes foram bloqueados nos estágios iniciais da interação. Porém não houve o isolamento das seqüências interrompidas nesses mutantes, não sendo possível verificar qual gene é responsável pelo fenótipo observado (Combiér et al., 2004).

Pela técnica de recuperação de plasmídeo foi possível identificar diferentes seqüências interrompidas no genoma dos mutantes obtidos do fungo *L. bicolor* (Kemppainen et al., 2008). No entanto, a análise das seqüências deduzidas de aminoácidos apresentou similaridade com proteínas com função desconhecida. Algumas proteínas apresentaram funções preditas de proteína serina treonina cinase, fator de transcrição, transportador di-tricarboxilato, proteína de ligação a RNA, entre outros. Utilizando a técnica de RT-PCR foi avaliada a expressão dos genes interrompidos de três linhagens mutantes. Essas seqüências interrompidas apresentaram similaridade com a proteína dedo de zinco tipo MYND, serina treonina cinase e transportador di-tricarboxilato. Não foi observado variação quanto ao nível de transcritos em relação ao controle, o que pode ser explicado pelo fato de ocorrer a presença de dois núcleos, onde somente um deles foi transformado. Nenhum destes mutantes avaliados mostrou fenótipo alterado na micorrização *in vitro* quando comparado com a linhagem selvagem (Kemppainen et al., 2008).

Um diferencial para o estudo funcional da simbiose ectomicorrízica utilizando o fungo *Laccaria* como modelo é devido ao fato do genoma de *L. bicolor* ter sido seqüenciado. Neste sentido, a transformação mediada por *A. tumefaciens* representa uma estratégia interessante, pois permitirá a obtenção de mutantes, por mutagênese insercional, e a conseqüente identificação de genes envolvidos com a interação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.M. Obtenção de protoplastos de fungos ectomicorrízicos e análise da diversidade genética de *Penicillium* spp. 64p. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- ABUODEH, R.O.; ORBACH, M.J.; MANDEL, M.A.; DAS, A.; GALGIANI, J.N. Genetic Transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *The Journal of Infectious Diseases*. 181:2106-2110, 2000.
- ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology*. 27:51-66, 1989.
- ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Canadian Journal of Botany*. 73:940-945, 1995.
- ANUNCIAÇÃO, C.E.; GUIMARÃES, W.V.; ARAÚJO, E.F.; MUCHOVEJ, R.M.; SOUZA, D.R.N. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. *Biotechnology. Techniques*. 4:215-220, 1990.
- BARRETT, V.; LEMKE, P.A.; DIXON, R.K. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30:381-387, 1989.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-Kingdom T-DNA Transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO journal*. 14:3206-3214, 1995.
- CAMPOS, D.T.S. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto. 2004. 82p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- CHADEGANI, M.; BRINK, J.J.; SHEHATA, A.; AHMADJAN, V. Optimization of protoplast formation, regeneration, and viability in *Microsporium gypseum*. *Mycopathologia*. 107:33-50, 1989.
- CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C.; ROMAINE, C.P. A Fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*. 66:4510-4513, 2000.

- CHENG, Y.; BÉLANGER, R.R. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseuozyma flocculosa*. FEMS Microbiology Letters. 190:287-291, 2000.
- CHU-CHOU, M.; GRACE, L.J. Hypogeous fungi associated with some forest trees in New Zealand. New Zealand Journal of Botany. 21:183-190, 1983.
- COELHO I.S.; QUEIROZ, M.V.; COSTA, M.D.; KASUYA, M.C.M.; ARAÚJO, E.F. Production and regeneration of protoplasts from orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza repens* and *Ceratorhiza* sp. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2008. Aceito para publicação.
- COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS Microbiology Letters. 220:141-148, 2003.
- COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; PÉPIN, R.; MARMEISSE, R. ; GAY, G. Nonmycorrhizal (Myc(-)) mutants of *Hebeloma cylindrosporum* obtained through insertional mutagenesis. Molecular Plant-Microbe Interact. 17:1029-1038, 2004.
- DEED, A.; SEVIOUR, R. Formation and regeneration of protoplasts of *Sclerotium glaucum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 31:259–264, 1989.
- DE GROOT, M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology. 16:817-842, 1998.
- DE VRIES, O.M.H.; WESSELS, J.G.H. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified  $\alpha$ -1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viridea*. Journal Genetic Microbiol. 76:319-330, 1973.
- DIAS, E.S.; ARAÚJO, E.F.; GUIMARÃES, W.V.; MUCHOVEJ, R.M.C. Production and regeneration of protoplast the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. World Journal Microbiology Biotechnology. 12:625-628, 1996.
- DILLEN, W.; DECLERCQ, J.; KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. The Plant Journal. 12:1459-1463, 2002.
- DUARTE, R.T.D.; STAATS, C.C.; FUNGARO, M.H.P.; SCHRANK. A.; VAINSTEIN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, W.; FURLANETO, M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Letters in Applied Microbiology. 44:248–254, 2007.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.E.; TAGU, D.; MARTIN. F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytologist. 165:599-611, 2005.
- EZERONYE, O.U.; DABA A.S.; OKWUJIAKO, I.A.; ONUMAJURU, I.C. Antibacterial Effect of Crude Polysaccharide Extracts from *Sclerotium* and Fruitbody (Sporophore) of *Pleurotus tuber-regium* (Fried) Singer on Some Clinical Isolates.

- International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences. 1:202-205, 2005.
- FANG, W.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; YANG, X.; DUAN, H.; LI, Y.; PEI, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85:18-24, 2004.
- FINCHAM, J.R. Transformation in fungi. *Microbiology and Molecular Biology*. 53:148-170, 1989.
- FINLAY R.D.; SÖDERSTRÖM, B. Mycorrhiza and Carbon Flow to Soil. In: ALLEN, M.F. *Mycorrhizal Functioning*, Chapman & Hall, London, 1992, pp134-160.
- FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological Research*. 107:803-810, 2003.
- FRETTINGER, P.; DERORY, J.; HERRMANN, S.; PLOMION, C.; LAPEYRIE, F.; OELMÜLLER, R.; MARTIN, F.; BUSCOT, F. Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. *Planta*. 225:331-340, 2007.
- FULLNER, K.J.; NESTER, E.W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 178:1498-1504, 1996.
- GIACHINI, A.J.; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in lantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. *Mycorrhiza*. 14:375–381, 2004.
- HAAS, J.H.; MOORE, L.W.; REAM, W.; MANULIS, S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Enviromental Microbiology*. 61: 2879-2884, 1995.
- HANIF, M.; PARDO, A.G.; GOLFER, M.; RAUDASKOSKI, M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics*. 4:183-188, 2002.
- HASHIBA, T.; YAMADA, M. Formation and purification of protoplast from *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 72:849-853, 1982.
- HASSEGAWA, R.H.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8, 2005.
- HÈBRAUD, M.; FÈVRE, M. Protoplast production and regeneration from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. *Canadian Journal of Microbiology*. 34:157-161, 1988.
- HINNEN, A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 75:1929–1933, 1978.
- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A.A. Binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*. 303:179-180, 1983.



HOOD, E.E.; GELVIN, S.B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA. A new *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*. 2:208-218, 1993.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em 12 de setembro de 2008.

JOHANSSON, T.; LE QUÉRÉ, A.; AHREN, D.; SÖDERSTRÖM, B.; ERLANDSSON, R.; LUNDEBERG, J.; UHLÉN, M.; TUNLID, A. Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:202-215, 2004.

KEMPPAINEN, M.; CIRCOSTA, A.; TAGU, D.; MARTIN, F.; PARDO, A.G. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza*. 16:19-22, 2005.

KEMPPAINEN, M.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; PARDO, A. T-DNA insertion, plasmid rescue and integration analysis in the model mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Microbial Biotechnology*. 1:258–269, 2008.

KIM, B.K.; KANG, J.H.; KIM, H.W.; SHIM, M.J.; CHOI, E.C. Mycelial protoplasts isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. *Life Science*. 66:1359-1367, 2000.

KROPP, B.R.; FORTIN, J.A. Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* *Canadian Journal of Botany*. 64:1224-1226, 1986.

KUMARI, J.A.; PANDA, T. Studies on critical analysis of factors influencing improved production off protoplasts from *Trichoderma reesei* micelium. *Enzymes and Microbial Technology*. 14:241-248, 1992.

LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:659-673, 2005.

LIMA, J.O.; SANTOS, J.K.; PEREIRA, J.F.; RESENDE, M.L.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetics*. 42:236-240, 2003.

LIN, J.; ZHENG, M.; WANG, J.; SHU, W.; GUO, L. Efficient transformation and expression of *gfp* gene in the edible mushroom *Pleurotus nebrodensis*. *Progress in Natural Science*, 18:819-824, 2008.

MACKENZIE, D.A.; JEENES, D.J.; ARCHER, D.B. Filamentous fungi as expression systems for heterologous proteins. In: ESSER, K.. *The Mycota II. Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, 2004. pp.289-315.

MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*: pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with pinus radiata. *New Phytologist*. 91:467-482, 1982.

- MARMEISSE, R.; DEBAUND, J.C.; CASSELTON, L.A. DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycology Research*. 96:161-165, 1992.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRÉN, D.; BRUN, A.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUÉE, M.; BROKSTEIN, P.; CANBÄCK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.; DANCHIN, E.G.J.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUCIC, E.; FREY-KLETT, P.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GÉRARD, J.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBÉ, J.; LIN, Y. C.; LEGUÉ, V.; LETACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; NICULITA-HIRZEL, H.; OUDOT-LESECQ, M.P.; PETER, G.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KÜES, U.; LUCAS, S.; VAN DE PEER, Y.; PODILA, G.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.; ROUZÉ, P.; SANDERS, I.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 452:88-92, 2008.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59:153-163, 1969.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V.L.R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*. 30:77-84, 1999.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vitad. and *Tilia americana* L. *Current Genetics*. 46:158-165, 2004.
- MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics*. 43:371-377, 2003.
- MICHIELSE, C.B.; ARENTSHORST, M.; RAM, A.F.J.; VAN DER HONDEL, C.A.M.J.J. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Current Genetics*. 42:9-19, 2005a.
- MICHIELSE, C.B.; HOOVKAAS, P.J.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; RAM, A.F.J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*. 48:1-17, 2005b.
- MICHIELSE, C.B.; RAM, A.F.J.; HOOYKAAS, P.J.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori* in the absence of full-length VirD2, VirC2, or VirE2 leads to insertion of aberrant T-DNA structures. *Journal de Bacteriology*. 186:2038-2045, 2003.
- MICHIELSE, C.B.; SALIM, K.; RAGAS, P.; RAM, A.F.J.; KUDLA, B.; JARRY, B.; PUNT, P.J.; HONDEL, C.A.M.J.J.; VAN, D.E.N. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Molecular Genetics and Genomics*. 271:499-510, 2004.

- MIKOSCH, T.S.; LAVRIJSEN, B.; SONNENBERG, A.S.; VAN GRIENSVEN, L.J. Transformation of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics*. 39:35-39, 2001.
- MUELLER, G.M.; HOSAKA, K. Using the *Laccaria-Hydangium* clade as a model to study diversity, biogeographic, and host specificity patterns of macrofungi. *Inoculum*. 59:30 (abstract), 2008.
- MULLINS, E.D.; CHEN, X.; ROMANE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insercional mutagenesis and gene transfer. *Phytopatology*. 91:173-180, 2001.
- MURATA, H.; IGASAKI, T.; SHISHIDO, K.; SUNAGAWA, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* that produces commercially valuable fruit bodies, matsutake. *Mycoscience*. 47:228-231, 2006a.
- MURATA, H.; SUNAGAWA, M.; YAMAZAKI, T.; SHISHIDO, K.; IGASAKI, T. Expression of the autofluorescent protein, DsRed2, in the recombinants of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus grevillei*, generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mycorrhiza*. 16:407-412, 2006b.
- OSMUNDSON, T.W.; CRIPPS, C.L.; MUELLER, G.M. Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*. 97:949-972, 2005.
- PARDO, A.G.; HANIF, M.; RAUDASKOSKI, M.; GORFER, M. Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycology Research*. 106:132-137, 2002.
- PARDO, A.G.; KEMPPAINEN, M.; VALDEMOROS, D.; DUPLESSIS, S.; MARTIN, F.; TAGU, D. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Revista Argentina de Microbiologia*. 37:69-72, 2005.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L.L. (eds). *More gene manipulations in fungi*. New York, Academic Press, 1991. pp 307-318.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*. 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTRY, D.C.; MOORE, P.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transaction of the British Mycological Society*. 67:23-26, 1976.
- PETER M, COURTY, P.E.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; RTIN, F. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 159:117-129, 2003.
- PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J.; HYMES, M. Molecular interactions in ectomycorrhizas: identification of fungal genes involved in early symbiotic

- interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. *Plant and Soil*. 244:117-128, 2002.
- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. *Molecular Genetics and Genomics*. 266:858-864, 2002.
- RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B.E.; HIDALGO-LARA, M.E.; REYES-MÁRQUEZ, B.E.; CABRERA-PONCE, J.L.; VALDÉS, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tintorius*. *Journal of Microbiological Methods*. 63:45-54, 2005.
- ROLLAND, S.; JOBIC, C.; FEVRE, M.; BRUEL, C., *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. *Current Genetics*. 44:164-171, 2003.
- ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98:967-974, 2003.
- RUIZ-DIEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 92:189-195, 2002.
- SALAS, M.G.; PARK, S.H.; SRIVATANAKUL, M.; SMITH, R.H. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports*. 2001:701-705, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, J.K. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-cacau no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oil seed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *Journal of Phytopathology*. 136:124-136, 1992.
- SHIRAHAMA, T.; FRUMAIS, T.; OKANISHI, M. A modified regeneration method for Streptomyces protoplasts. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45:1271-1273, 1981.
- SIDOROVA, I.I.; VELIKANOV, L.L. Bioactive substances of agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco- and microbiota structure in soils of forest ecosystems. I. Antibiotic activity of water extracts from basidioms of several dominant agaricoid basidiomycetes. *Mikologija i fitopatologija*. 34:11-17, 2000.
- SIMARD, S.W., DURALL, D.M. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Canadian Journal of Botany*. 82:1140-1165, 2004.

- SMÂNIA, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) merr. *Journal Ethopharmacology*. 45:177-181, 1995.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academy Press, 1997. 605p.
- SOLÍS, S.; FLORES, M.E.; HUITRÓN, C. Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinolytic enzyme production. *Letters in Applied Microbiology*. 23:36-42, 1996.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Protoplasts preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia*. 80:141-150, 1988.
- SULLIVAN, T.D.; ROONEY, P.J.; KLEIN, B.S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryotic Cell*. 1:895-905, 2002.
- SUN, C.B.; KONG, Q.L.; XU, W.S. Efficient transformation of *Penicillium chrysogenum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 2002.
- TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KUBO, Y.; YAMAMOTO, M.; TOYODA, K.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y.; SHIRAIISHI, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. *Journal of General Plant Pathology*. 70:93-96, 2004.
- TRAPPE, J.M. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review*. 28:538-606, 1962.
- TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAIISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology*. 69:230-239, 2003.
- VAIDYA, G.S.; SHRESTHA, K.; WALLANDER, H. Antagonistic study of ectomycorrhizal fungi isolated from baluwa forest (central nepal) against with pathogenic fungi and bacteria. *Scientific World*. 3:49-52, 2005.
- VAN DER RHEE, M.D.; GRACA, P.M.A.; HUIZING, H.J.; MOOIBROEK, H. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular Genetics and Genomics*. 250:252-258, 1996.
- VICKERS, J.E.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J. A protocol for the efficient screening of putatively transformed plants for *bar*, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology Reporter*. 4: 363-368, 1996.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globules-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal*. 2001. 25:181-191, 2001.

WHITE, J.; CHANG, S.Y.P.; M.J. BIBB, M.J; BIBB, M.J. A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygrosopicus*: A selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Research*. 18:1062, 1990.

YANAGI, S.O.; TAKEBE, I. An efficient method for the isolation of mycelia protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other basidiomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 19:58-60, 1984.

ZARETSKY; M.; SITRIT, Y.; MILLS, D.; ROTH-BEJERANO, N.; KAGAN-ZUR, V. 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, 2006.

ZIPECODEZOO. Disponível em: <http://zipcodezoo.com/>. Acesso em 10 de setembro de 2008.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Na fase pré simbiótica são ativados genes que codificam possíveis proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, de aminoácidos, e energético, transcrição e síntese de proteínas, comunicação celular, transdução de sinal, resposta a estresse, transposons e proteínas relacionadas à biogênese de componentes celulares;

A expressão diferencial dos genes que codificam piruvato desidrogenase, ATP sintase, proteína do canal seletivo de íon dependente de voltagem, acetil-CoA acetiltransferase e hidrofobina durante a fase pré-simbiótica, confirma a ativação dos genes relacionados à beta-oxidação e ao metabolismo mitocondrial na fase pré-simbiótica da associação, além de validar a biblioteca subtrativa supressiva construída.

Cerca de  $10^7$  protoplastos do fungo *Hydnangium* sp. foram obtidos após duas horas de incubação em KCl 0,6 M, na presença de 20 mg/mL da preparação enzimática “Lysing Enzymes” e 0,3 g de micélio fúngico com dois dias de idade.

Não foi possível regenerar protoplastos de *Hydnangium* sp. nas condições testadas.

Não foi possível a transformação de *Hydnangium* sp. mediada por *A. tumefaciens* nas condições testadas.

O fungo *Hydnangium* sp. inibiu o crescimento das linhagens de *A. tumefaciens* utilizadas.

A eficiência de transformação do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata*, mediada por *A. tumefaciens*, foi de 32,6 %.