

BLANCA MERCEDES LEGUÍZAMO BETANCOURTH

**MORFOLOGIA DA ECTOMICORRIZA *Scleroderma laeve* -
Eucalyptus grandis E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE QUE
CODIFICA A SUBUNIDADE SEIS DE ATP SINTASE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

BLANCA MERCEDES LEGUÍZAMO BETANCOURTH

**MORFOLOGIA DA ECTOMICORRIZA *Scleroderma laeve* -
Eucalyptus grandis E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE QUE
CODIFICA A SUBUNIDADE SEIS DE ATP SINTASE**

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

APROVADA: 19 de julho de 2011

Prof. Wagner Campos Otoni

Pesquisadora Eliane Aparecida Gomes

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof^a Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; e o conhecimento do Santo é o entendimento.

Provérbios 9:10

A Deus que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera, porque de Ele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas. Aos meus pais e meus irmãos pelo o seu imenso amor que me tornou a mulher que sou hoje. À minha querida orientadora, Elza Fernandes de Araújo, por esta oportunidade, por todo o seu carinho e os seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso, que desde antes que nascera, planejou este momento na minha vida. Porque me elegeu desde o princípio para que fosse Dele e recebesse tudo o que Ele tinha prometido. Assim tinha decidido Deus, quem faz todas as coisas seguindo o desígnio da sua vontade (*Efésios 1:11*).

Aos meus pais e meus irmãos, que com seu amor e apoio incondicional me animaram a continuar lutando por este sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Brasil, que abriram as portas para alcançar esta meta.

Aos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e de Microbiologia Agrícola, pela excelente formação oferecida.

À minha querida orientadora, professora Elza, pela oportunidade que me deu de fazer parte de sua equipe de trabalho, pela orientação, dedicação, por todos os ensinamentos e pelo carinho brindado.

Às professoras Maria Catarina, Marisa e Denise pela formação brindada, pelos ensinamentos, sugestões e apoio. Aos demais professores dos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e de Microbiologia Agrícola, pelos valiosos ensinamentos.

A Fernando Moreira e aos meus amigos estrangeiros, obrigada por me dar não só amizade, mas também uma família, por ser um grande apoio para me esforçar e alcançar minha meta.

Agradeço a todos os meus companheiros do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos que com conhecimentos, amizade e companhia aportaram para a realização desta meta: Janaina, Matheus, Mariane, Thamy, Monalessa, Alexander, Carolina, Jaqueline, Tiago e Leonardo. Marina, Regina e Guilherme, muito obrigada pela sua amizade e pelo o apoio nos momentos difíceis. Agradeço especialmente à Maíra de Freitas por ter-me acompanhado e ajudado durante toda a realização da minha pesquisa.

Ao Laboratório de associações Micorrízicas, por me abrir as portas para a realização da minha pesquisa. Aos técnicos do BIOAGRO, os senhores Danilo, Evandro e Paulo por toda a colaboração oferecida durante o mestrado.

A todos vocês que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho. Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Blanca Mercedes Leguízamo Betancourth, filha de Idulfo Leguízamo Pulido e Libia María Betancourth Cano, nasceu em Planeta Rica, Córdoba–Colômbia, no dia 6 de junho de 1984. Em agosto de 2002, ingressou na Universidade de Córdoba (Colômbia), graduando-se como bióloga em dezembro de 2008. Em agosto de 2009, ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Organismos e condições de cultivo.....	14
3.2. Desinfestação das sementes e obtenção de plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i>	15
3.3. Estabelecimento da associação ectomicorrízica entre <i>Scleroderma laeve</i> e <i>Eucalyptus grandis</i> utilizando a micorrização <i>in vitro</i>	15
3.3.1. Fase Pré-simbiótica	16
3.3.2. Fases de colonização, diferenciação e funcionamento	18
3.4. Amplificação e caracterização da seqüência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em <i>Scleroderma laeve</i>	20
3.5. Clonagem e sequenciamento do produto da PCR.....	21
3.6. Extração de RNA total do micélio de <i>Scleroderma laeve</i> , das ectomicorrizas e de <i>Eucalyptus grandis</i> e avaliação da expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase por RT-PCR.....	22

3.7. Análise filogenética do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em Basidiomicetos.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Síntese <i>in vitro</i> e avaliação morfológica das ectomicorrizas	25
4.2. Amplificação e caracterização da seqüência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em <i>Scleroderma laeve</i>	33
4.3. Avaliação da expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase por RT-PCR	35
4.4. Análise filogenética do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em Basidiomicetos.....	37
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Sistema de micorrização *in vitro* para a fase pré-simbiótica. Sementes de *Eucalyptus grandis* colocadas sobre meio de síntese após a desinfestação (a). Plântulas de *E. grandis*, um dia (b) e três dias após transferência para meio de cultivo (c). Plântulas de *E. grandis* com três dias após transferência e logo inoculadas com *Scleroderma laeve* Lloyd (d), 15 (e) e 30 dias após inoculação (f)..... 17
- Figura 2 Sistema de micorrização *in vitro* das fases de colonização, diferenciação e funcionamento. Micélio do fungo *Scleroderma laeve* cultivado por 30 dias em meio MNM (a). Discos de ágar contendo micélio do fungo *S. laeve* cultivados em placas de petri contendo meio de cultivo MNM modificado coberto com filtro de papel celofane (b). Micélio do fungo *S. laeve* cultivado por 20 dias em placas de petri contendo meio de cultivo MNM modificado coberto com filtro de papel celofane (c). Plântulas de *E. grandis* e *S. laeve* Três dias após contato (colonização) (d); 15 dias de contato (diferenciação) (e), e 30 dias de contato (funcionamento) (f) 19
- Figura 3 Mudanças morfológicas durante a fase pré-simbiótica da micorrização *in vitro* entre plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Scleroderma laeve*. Raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado (controle) mostrando o desenvolvimento das raízes laterais (a), (b). Corte transversal da raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado (c). Raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado, coberta

	com papel celofane e inoculada com <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento das raízes laterais (d) , (e) . Corte transversal da raiz de <i>E. grandis</i> após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado, coberta com papel celofane e inoculada com <i>S. laeve</i> (c)	26
Figura 4	Hifas fúngicas de <i>Scleroderma laeve</i> colonizando a superfície de raiz de <i>Eucalyptus grandis</i> aos dois dias de contato	27
Figura 5	Mudanças morfológicas durante a fase de colonização da micorrização <i>in vitro</i> entre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Scleroderma laeve</i> . Raiz de <i>E. grandis</i> após três dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle) (a) , (b) . Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após três dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c) . Raiz de <i>E. grandis</i> após três dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> (d) , (e) . Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após três dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento do manto (Ma) (f)	28
Figura 6	Mudanças morfológicas durante a fase de diferenciação da micorrização <i>in vitro</i> entre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Scleroderma laeve</i> . Raiz de <i>E. grandis</i> após 15 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle), mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e a presença de pêlos radiculares (a) , (b) . Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após 15 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c) . Raiz de <i>E. grandis</i> após 15 dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e perda de pêlos radiculares (d) , (e) . Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após 15 dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento do manto (Ma). Hifas começam a forçar a entrada entre algumas células da epiderme formando a Rede de Hartig (Rh) (f)	31
Figura 7	Mudanças morfológicas durante a fase de funcionamento da micorrização <i>in vitro</i> entre plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> e	

	<p><i>Scleroderma laeve</i>. Raiz de <i>E. grandis</i> após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle) mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e a presença de pêlos radiculares (a), (b). Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c). Raiz de <i>E. grandis</i> após 30 dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e perda de pêlos radiculares (d), (e). Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> após 30 dias de contato com micélio de <i>S. laeve</i> mostrando o desenvolvimento do manto (Ma) e da Rede de Hartig (Rh) (f)</p>	32
Figura 8	<p>Perfil eletroforético dos produtos de amplificação. Marcador 1kb, cDNA (1), DNA genômico de <i>Scleroderma laeve</i> (2) e controle negativo da reação (3)</p>	33
Figura 9	<p>Alinhamento das sequências de nucleotídeos de <i>Scleroderma laeve</i> (acesso AF114457.1), <i>Scleroderma hypogaeum</i> (acesso AF114458.1), <i>Pisolithus arhizus</i> (acesso AF114456.1) e <i>Gyroporus cyanescens</i> (acesso AF114459.1) para o gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase encontradas no NCBI. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados e as direções das amplificações estão indicadas. As linhas pontilhadas indicam as bases conservadas entre as sequências (Clustal W)</p>	34
Figura 10	<p>Análise do RT-PCR do gene que codifica subunidade seis de ATP sintase (A) e subunidade ribossomal 17S (B). Marcador de DNA 100 pb Ladder (M). ECM fase pré-simbiótica (1). ECM fase colonização (2). ECM fase diferenciação (3). ECM fase funcionamento (4). Micélio fúngico pré-simbiótico (5). Micélio fúngico três dias (6). Micélio fúngico 15 dias (7). Micélio fúngico 30 dias (8). DNA genômico de <i>Scleroderma laeve</i> (9). Controle negativo da reação (10)</p>	35
Figura 11	<p>Alinhamento das sequências protéicas da subunidade seis de ATP sintase. Foram usados para o alinhamento as sequências de <i>Scleroderma laeve</i> (acesso AAD26683.1), <i>Scleroderma hypogaeum</i> (acesso AAD26684.1), <i>Pisolithus arhizus</i> (acesso AAD26682.1) e <i>Gyroporus cyanescens</i> (acesso AAD26685.1).</p>	

São mostrados os domínios conservados entre estas (caixas em destaque). O alinhamento foi feito utilizando o banco de dados de domínios conservados do NCBI sendo identificadas essas sequências como membros da superfamília MTH00175 39

Figura 12 Análise filogenética das sequências protéica da subunidade seis da proteína ATP sintase em basidiomicetos. A árvore foi baseada na comparação de sequências de polipeptídeos do gene que codifica a subunidade seis da ATP sintase de *Scleroderma laeve*. A construção foi baseada no método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo. A distância dos ramos está indicada na parte inferior (MEGA 4.0.2) 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fungos Basidiomicetos utilizados na análise filogenética das sequências de aminoácidos do gene que codifica a subunidade seis da ATP sintase.....	24
----------	---	----

RESUMO

LEGUÍZAMO BETANCOURTH, Blanca Mercedes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Morfologia da ectomicorriza *Scleroderma laeve* - *Eucalyptus grandis* e análise da expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Coorientadoras: Marisa Vieira de Queiroz e Maria Catarina Megumi Kasuya.

Scleroderma laeve é um fungo Basidiomiceto capaz de formar ectomicorrizas com *Eucalyptus grandis*. Foi observado aumento significativo do número de raízes laterais em plântulas de *E. grandis* em contato com *S. laeve* durante a fase de pré-infecção em relação às plântulas não inoculadas. A inoculação com *S. laeve* também aumentou o número de raízes laterais em plântulas de *E. grandis* durante as etapas de colonização, diferenciação e funcionamento em relação às plântulas não inoculadas. No terceiro dia de contato entre o fungo e a planta, foi observado alongamento parcial das células da epiderme e formação do manto fúngico e no 15º dia foi observada a iniciação da formação da rede de Hartig. No trigésimo dia, o número de raízes laterais nas plântulas em contato com o fungo foi quatro vezes maior do que nas plântulas controle. Ocorreu, ainda, alongamento das células da epiderme e engrossamento do manto. As raízes laterais emergentes que formavam as ectomicorrizas não apresentavam pêlos radiculares, estavam totalmente envolvidas pelo manto fúngico e possuíam a rede de Hartig completamente formada entre as células alongadas da epiderme. Utilizando o sistema *in vitro* foi possível acompanhar, retirando-se raízes laterais e ectomicorrizas em diferentes estádios, as mudanças morfológicas da simbiose e de expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve*. A seqüência parcial do gene

obtida possui 503 pb, na qual não foi observada a presença de introns. Essa sequência apresentou identidade com as sequências dos genes que codificam a subunidade seis de ATP sintase em *S. hypogaeum*, *Pisolithus arhizus*, *Gyroporus cyanescens*, entre outros, confirmando o parentesco entre esses organismos. A análise da expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve* por RT-PCR, nas diferentes etapas da associação, mostrou que esse gene é expresso em todas as etapas da micorrização.

ABSTRACT

LEGUÍZAMO BETANCOURTH, Blanca Mercedes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Morphology of *Scleroderma laeve*-*Eucalyptus grandis* ectomycorrhizas and expression analysis of the six subunit of ATP synthase gene.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-Advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Maria Catarina Megumi Kasuya.

Scleroderma laeve is a basidiomycete fungus capable of forming ectomycorrhizas with *Eucalyptus grandis*. Significant increases in lateral root production were observed in *E. grandis* plants inoculated with *S. laeve* during the pre-symbiotic phase. This was also observed during the colonization, differentiation, and functioning stages of the symbiosis. On the third day of contact of the fungus with the host, the partial elongation of epidermal cells and mantle formation were observed, and, on the fifteenth day, the beginning of Hartig net formation was evident. On the 30th day, lateral root numbers in the plants in contact with the fungus was higher than in the control plants. The elongation of the epidermal cell and the thickening of the mantle could also be observed. The emerging lateral roots colonized by the fungus did not present root hairs, were completely enveloped by the fungal mantle, and had a fully developed Hartig net between the epidermal cells. The periodical sampling of lateral roots and ectomycorrhizas at different developmental stages in the *in vitro* system allowed following the morphological development of ectomycorrhizas and the corresponding changes in the expression of the gene coding for ATP synthase subunit VI in *S. laeve*. The partial sequence of the ATP synthase subunit VI gene obtained possesses 503 bp and no intron. This sequences showed an identity to the sequences of

the genes that code for e ATP synthase subunit VI in *Scleroderma hypogaeum*, *Pisolithus arhizus*, and *Gyroporus cyanescens*, among others, confirming the close relationship among these organisms. The expression analysis of the ATP synthase subunit VI gene in *S. laeve* by RT-PCR, at the different developmental stages of the symbiotic association, showed that the gene is expressed in all the phases of mycorrhization.

1. INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas (ECM) são associações mutualistas entre o sistema radicular das plantas e certos fungos do solo. Essa associação contribui com a planta, permitindo uma melhor nutrição, além de torná-la mais tolerante a estresse biótico, por exemplo, infecção por patógenos, ou abiótico, como alta concentração de metais pesados e altas temperaturas (Hause & Fester, 2004; Bonfante & Anca, 2009). O fungo auxilia a planta na obtenção de nutrientes, como fósforo e oligoelementos de fontes orgânicas e inorgânicas do solo e, em contrapartida, o fungo recebe carbono orgânico proveniente da planta (Horton & Bruns, 2001).

A associação ectomicorrízica é caracterizada pela ausência de pelos radiculares, pela formação do manto fúngico e da Rede de Hartig (Burgess *et al.*, 1996). Essas simbioses predominam em famílias de plantas nas quais se encontram as espécies mais utilizadas em silvicultura no mundo, incluindo espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*. No Brasil foram descritas associações dessas plantas com fungos ectomicorrízicos pertencentes aos gêneros *Scleroderma*, *Pisolithus*, *Laccaria*, *Hydnangium*, entre outros (Campos, 2004; Giachini *et al.*, 2004).

Os fungos do gênero ectomicorrízico *Scleroderma* pertencem à família Sclerodermataceae e estão distribuídos em regiões temperadas e tropicais em todo o mundo. Espécies de *Scleroderma* estabelecem associações ectomicorrízicas com várias espécies de *Eucalyptus* (Burgess & Malajczuk 1990; Reddell & Milnes 1992; Burgess *et al.*, 1993; Aggangan *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999; Dell *et al.*, 1994; Reddy & Satyanarayana 1998; Chen *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2000; Gusmailina *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006). Existem poucos trabalhos onde é descrito o desenvolvimento

da formação de ectomicorrizas nessas plantas e até hoje não foi publicada qualquer pesquisa relatando as fases e mudanças morfológicas na formação ectomicorrízica na associação com *Scleroderma* sp., possivelmente em razão do lento crescimento desses fungos e da falta de um sistema de micorrização *in vitro* que facilite esse tipo de estudo. Dessa mesma forma, na literatura consultada não foram encontradas pesquisas destinadas à avaliação dos genes que são expressos para promover a associação ectomicorrízica entre esses organismos. Pesquisas visando ao entendimento do processo de formação de ectomicorrizas na interação entre *Eucalyptus* e fungos ectomicorrízicos, como os pertencentes ao gênero *Scleroderma*, são importantes para o estudo das espécies fúngicas que poderão ser úteis em futuros programas de inoculação, bem como no estudo das relações ecológicas entre o fungo simbiote e a planta hospedeira.

O desenvolvimento da associação ECM envolve vários genes que estão relacionados com a complexa série de fases progressivas e inter-dependentes (Martin *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2005). Pesquisas realizadas sobre as respostas de fungos micorrízicos na fase de pré-simbiótica revelaram a indução de vários genes relacionados à atividade mitocondrial. Além disso, foi observado aumento na taxa de respiração e no número de mitocôndrias nesses fungos (Valot *et al.*, 2005).

Durante a fase pré-simbiótica, a ATP sintase pode fornecer o ATP necessário para sustentar as funções dependentes de energia durante a associação micorrízica (Ezawa *et al.*, 2002; Ferrol *et al.*, 2002; Valot *et al.*, 2005). A ativação da cadeia respiratória deve estar relacionada com a ativação do metabolismo de carboidratos ao longo do ciclo do ácido cítrico. Estudos sobre a expressão desses genes são importantes para o entendimento da complexidade dos mecanismos que ocorrem durante a formação da ECM (Mankel *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve como objetivos estabelecer *in vitro* a associação ectomicorrízica entre *S. laeve* e *E. grandis*, avaliar morfológicamente as diferentes fases da associação, amplificar e caracterizar a sequência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase no fungo *S. laeve* e analisar a sua expressão nas diferentes fases da simbiose ectomicorrízica com *E. grandis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O estudo do solo tem sido intensificado nas últimas décadas, sobretudo nos aspectos relacionados aos seus organismos dentre os quais se destacam os simbioses, tais como as micorrizas, por exercerem significativo papel na funcionalidade e manutenção dos ecossistemas naturais. Pesquisas envolvendo fungos micorrízicos têm como objetivo prático aumentar a produção de madeira e alimento, reduzir o uso de fertilizantes químicos e contribuir para alcançar um padrão de agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos (Souza *et al.*, 2006).

As micorrizas são associações entre raízes e determinados fungos do solo, que ocorrem na maioria das espécies vegetais superiores. Existe um envolvimento dessa associação na nutrição e crescimento das plantas (Loewe *et al.*, 2000). A colonização das raízes pelos fungos resulta no desenvolvimento de micélio abundante na rizosfera, o que favorece a absorção de nutrientes do solo. Uma vez que a rede de hifas das micorrizas se estenda vários centímetros para além da rizosfera, as plantas se tornam aptas a obter nutrientes a partir de volume de solo muito maior do que seria possível sem as micorrizas. A simbiose ectomicorrízica provoca um aumento na translocação de carboidratos para o sistema radicular e até 30% da produção total de fotoassimilados podem ser transferidos para o fungo, permitindo a sua manutenção e proliferação (Loewe *et al.*, 2000).

Há dois grupos principais de micorrizas: as endomicorrizas ou micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas (ECM). As primeiras são as mais comuns, ocorrendo em cerca de 80% das plantas vasculares. Nesse tipo de micorrizas, a hifa do fungo penetra nas células corticais da raiz da planta, onde são formados os arbúsculos,

pequenas estruturas densamente ramificadas, onde ocorre a maioria das trocas entre o fungo e a planta. A hifa se estende para o solo por vários centímetros, aumentando significativamente a quantidade absorvida de fosfato e outros nutrientes essenciais (Ferrol *et al.*, 2002; Valot *et al.*, 2005).

As ectomicorrizas são encontradas em certos grupos de árvores e arbustos, principalmente, em regiões temperadas. Esses grupos incluem as famílias Fagaceae, Betulaceae, Dipterocarpaceae, Salicaceae e Pinaceae (Horton & Bruns, 2001). Essas associações tornam as árvores mais tolerantes às rigorosas condições de frio e de seca que ocorrem nessas zonas (Horton & Bruns, 2001).

As espécies fúngicas que estão envolvidas nas associações ectomicorrízicas, em sua maioria, pertencem a basidiomicetos, mas algumas envolvem associações com ascomycetos e zigomicetos, geralmente com alto grau de especificidade nas associações (Horton & Bruns, 2001). Apesar do grande número de fungos e espécies vegetais que são capazes de formar ECM, a organização desse tecido apresenta características comuns (Tagu *et al.*, 2002). Isto sugere a presença de um controle geral do desenvolvimento e manutenção da simbiose durante as diferentes fases da associação (Le Quéré *et al.*, 2005).

A formação da ectomicorriza pode ser dividida em quatro fases: pré-simbiótica, colonização, diferenciação e funcionamento. Na fase de pré-simbiótica, acontece troca de sinais entre as raízes das plantas e os fungos para o reconhecimento mútuo, as raízes e o micélio fúngico começam a crescer e estabelecem contato físico (Le Quéré *et al.*, 2005, Tagu *et al.*, 2002). A formação da associação inicia-se a partir da interface formada entre os propágulos do fungo no solo, que podem ser esporos e hifas que crescem de raízes colonizadas (colonização secundária).

O estabelecimento da simbiose ectomicorrízica inicia-se pela ativação dos propágulos do fungo que, no caso de esporos, germinam e formam uma complexa rede de hifas na rizosfera, colonizando a superfície das raízes e, finalmente, penetrando-a entre as lamelas celulares na Zona de colonização Micorrízica. O fungo envolve, mas não penetra nas células vivas e as hifas crescem entre as células do córtex da raiz (Ditengou *et al.*, 2000).

Depois da fase pré-simbiótica ocorre a comunicação de fatores de compatibilidade. O micélio fúngico em torno da raiz sofre rápida transformação

morfológica, ocorrendo aumento de hifas e de ramificação das mesmas (Le Quéré *et al.*, 2005, Tagu *et al.*, 2002). As raízes são circundadas por um manto de hifas, a partir do qual cordões miceliais se estendem pelo solo vizinho. As hifas penetram as células da epiderme das raízes a partir da região mais interna do manto. Após a penetração, as hifas colonizam o córtex intercelularmente, por meio da digestão enzimática da lamela média, com ocupação de todo o espaço intercelular, dando origem à Rede de Hartig, que é intra-radicular, ao manto e aos rizomorfos, que são extra-radulares. Todas essas estruturas resultam de diferenciações morfológicas no micélio do fungo. A Rede de Hartig, eventualmente, circunda muita das células corticais. Essa rede funciona como interface entre o fungo e a planta e parece prolongar a vida, tanto das células fúngicas como da raiz (Souza *et al.*, 2006).

As células fúngicas tornam-se multinucleadas e há aumento no número de mitocôndrias e retículo endoplasmático, o que sugere alta atividade metabólica nessas células (Tagu *et al.*, 2002). Uma vez estabelecida a colonização primária, ela tende a se perpetuar, pelo acompanhamento do crescimento apical da raiz, da colonização secundária, resultante do micélio extra-radicular e da elevação do potencial de inóculo na rizosfera (Martin *et al.*, 2001; Tagu *et al.*, 2002).

Além da especificidade fungo–hospedeiro, as ectomicorrizas apresentam fenômenos de sucessão dos fungos em função da idade das plantas. Os fungos ectomicorrízicos são separados em dois grupos: os de estado inicial e os de estado tardio (Mason *et al.*, 1982; Last *et al.*, 1984). Danielson (1984) acrescentou um terceiro grupo: o dos fungos multiestados, representado pelos fungos presentes durante todo o ciclo de vida das plantas.

No Brasil, Giachini & Oliveira (1996) observaram casos de sucessão em plantações de *Pinus* sp. No estudo, realizado em plantações de diferentes idades, as frutificações de certos fungos, como *Amanita* sp., *Lactarius* sp. e *Suillus* sp. foram observadas predominantemente nos plantios de idade avançada. Outros fungos, como *Laccaria* sp. e a maioria das espécies de *Scleroderma*, parecem constituir o grupo multiestados, tendo sido observados em plantações de todas as idades (Souza *et al.*, 2006).

As ectomicorrizas predominam em famílias de plantas nas quais encontram-se as espécies mais utilizadas em silvicultura no mundo como as dos gêneros *Eucalyptus* e

Pinus. Os plantios de eucalipto podem ocupar solos de baixa fertilidade, justificando a busca de técnicas para melhorar a sobrevivência, a tolerância ao estresse e a produtividade das plantações. Assim, é necessário o conhecimento prévio das espécies de fungos micorrízicos existentes e a seleção de fungos eficazes na promoção do crescimento e sobrevivência das plantas sob diferentes condições de ambiente (solo, clima, etc.) (Souza *et al.*, 2008).

O eucalipto é uma angiosperma da família Myrtaceae. Pela extensa área plantada no Brasil e pelo seu potencial de utilização como matéria-prima para indústrias, representa o gênero mais importante de espécie florestal plantada no país. Os povoamentos comerciais de eucalipto no mundo ocupam cerca de 20 milhões de hectares, sendo o Brasil o país com a maior área cultivadas com cerca de 4 milhões de hectares. O estado com a maior área cultivada com eucalipto é Minas Gerais, com cerca de 1 milhão e cem mil hectares em 2007 (Gus-GITForestry, 2009).

Dentre as aproximadamente 150 espécies de eucalipto introduzidas no Brasil, *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden é a mais comumente utilizada (Higa *et al.*, 2000). Sua madeira é usada com fins energéticos (fonte de energia ou carvão vegetal), para produção de celulose de fibra curta, na construção civil e em serrarias (Higa *et al.*, 2000). Pelas suas características silviculturais e tecnológicas favoráveis, aliadas ao seu bom desenvolvimento em amplas condições ecológicas, *E. grandis* vem recebendo cada vez mais atenção tanto no Brasil como em outros países com clima tropical.

Plantas do gênero *Eucalyptus* têm a característica de se associar a fungos ectomicorrízicos. Costa *et al.* (2010) estudaram a formação de ectomicorriza *in vitro* por isolados monocarióticos e dicarióticos de *Pisolithus microcarpus* em *E. grandis* concluindo que os isolados monocarióticos utilizados nesse estudo foram capazes de formar ectomicorrizas com *E. grandis*. Pereira *et al.* (2005) observaram uma grande variação entre os isolados de *Pisolithus* de diferentes localidades e de diferentes hospedeiros naturais na sua habilidade para formar micorrizas com *E. grandis* e *E. urophylla*.

A inoculação de *Eucalyptus* com fungos ectomicorrízicos (ECM) compatíveis tem demonstrado ser benéfica em muitas partes do mundo, sendo sugerido que esses fungos ajudam a melhorar a produtividade das plantações de eucalipto. À medida que o conhecimento da diversidade dos fungos ectomicorrízicos aumenta em diferentes

ecossistemas e regiões do planeta, são requeridos novos estudos, em relação aos diferentes hospedeiros e às diferentes condições edafo-climáticas, antes de se decidir pela escolha de fungos para inoculação (Souza *et al.*, 2008). Também são importantes os estudos comparativos sobre a infectividade e a eficiência de isolados de *Scleroderma*, uma vez que fungos desse gênero colonizam facilmente as raízes de eucalipto e são muito utilizados para a inoculação em programas de reflorestamento (Chen *et al.*, 2006; Sanon *et al.*, 2009).

A seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes na promoção do crescimento de mudas de eucalipto apresenta-se como uma alternativa biotecnológica capaz de promover ganhos na produção e aumento da oferta de madeira, por meio da obtenção e uso de inóculos em programas controlados de micorrização para reflorestamentos. Além disso, pode auxiliar na redução de uso de fertilizantes fosfatados solúveis nos viveiros e no campo (Mello, 2006).

Os fungos do gênero ectomicorrízico *Scleroderma* pertencem à família Sclerodermataceae e estão distribuídos em regiões temperadas e tropicais em todo o mundo. *Scleroderma* é o gênero de maior ocorrência, com cerca de 30 espécies, das quais 13 são conhecidas no Brasil (Guzmán, 1970; Baseia & Milanez, 2000; Giachini *et al.*, 2000; Meijer, 2006; Gurgel *et al.*, 2008). Várias espécies de *Scleroderma* foram notificadas no Rio Grande do Sul (Rick, 1961; Guzmán, 1970; Sobestiansky, 2005) e em Santa Catarina (Giachini *et al.*, 2000). As espécies pertencentes a esse gênero são fungos simbiotes que estabelecem associações com plantas de regiões tropicais e temperadas, incluindo várias espécies de importância econômica. Esses fungos são candidatos para programas de inoculação, uma vez que aparentemente se adaptam a vários ecossistemas e são fáceis de usar como inóculo (Sanon *et al.*, 2009).

Embora sejam reconhecidos os benefícios da associação ECM para plantas de eucalipto, existem poucos trabalhos sobre o desenvolvimento de ectomicorrizas e as mudanças morfológicas ocorridas durante o estabelecimento da associação com espécies de *Scleroderma*, possivelmente em razão ao lento crescimento desses organismos e da falta de um sistema de micorrização *in vitro* que facilite esse tipo de estudos.

As pesquisas visando ao entendimento do processo de formação de ectomicorrizas na interação entre *E. grandis* e fungos ectomicorrízicos como

Scleroderma, são importantes para o estudo das espécies fúngicas que poderão ser úteis em futuros programas de inoculação, bem como no estudo das relações ecológicas entre o fungo simbiote e a planta hospedeira.

Para permitir ou manter a comunicação entre as células do fungo e das raízes é estabelecida uma sinalização que envolve detecção de moléculas para adaptar-se rapidamente às mudanças no ambiente extracelular e para enviar sinais intra-celulares ao núcleo através de vias de transdução (Lagrange *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001). O tecido simbiótico final resulta de integração física das células da raiz com as do fungo. Uma comunicação celular equilibrada entre os dois parceiros é conduzida e finamente regulada no tempo e no espaço por meio de interações entre os genótipos da planta e do fungo que envolve a percepção de mudanças no ambiente, a comunicação célula a célula, e a construção de novas estruturas celulares. Esse equilíbrio é provavelmente dependente de um balanço finamente ajustado entre a capacidade de formar uma simbiose e das condições ambientais que podem aumentar ou reprimir o estabelecimento da simbiose (Martin *et al.*, 2001).

Ao contrário de algumas outras interações planta-microorganismo (Dénarié *et al.*, 2006; Moller & Chua, 1999), a natureza das moléculas de sinalização e as bases moleculares de percepção e transdução de sinal em micorrizas são pouco conhecidas. As plantas hospedeiras liberam na rizosfera metabolitos críticos que são capazes de desencadear a germinação de basidiósporos, crescimento de hifas em direção à raiz e a iniciação do desenvolvimento da formação da micorriza (Ditengou & Lapeyrie, 2000; Martin *et al.*, 2001).

As moléculas que controlam a interação entre os simbioses estão envolvidas no tropismo de hifas nos tecidos do hospedeiro (sinais rizosférico), na fixação e invasão dos tecidos do hospedeiro pelas hifas (adesinas, hidrolases), indução de programas organogénicos em células fúngicas e da raiz (hormônios e sinais secundários), evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro pelo fungo e na troca coordenada de carbono e outros metabolitos (Martin *et al.*, 2001).

Os sinais iniciais secretados na rizosfera pela planta hospedeira durante a interação com microorganismos podem incluir flavonóides, diterpenos, hormônios e vários nutrientes. Metabolitos, como flavonol, rutina, cirocinina e zeatina, modificam notavelmente a morfologia das hifas fúngicas (Lagrange *et al.*, 2001). Foi demonstrado

que em concentrações muito baixas, rutina estimula o crescimento de *Pisolithus* enquanto a citocinina e a zeatina modificam o ângulo de ramificação das hifas (Martil *et al.*, 2001).

Os exudados da raiz e a zeatina também provocam um acúmulo maior de moléculas fúngicas como hipofarinas, a betaína de triptofano. Esse alcalóide fúngico é o maior composto indólico isolado do fungo ectomicorrízico *Pisolithus* e é produzido em grandes quantidades durante o desenvolvimento da associação. As hipofarinas secretadas por *Pisolithus* induzem alterações morfológicas nos pêlos radiculares em plantas de *Eucalyptus* e a presença dessas moléculas leva a uma diminuição na taxa de alongamento e um inchaço transitório do ápice dos pêlos radiculares (Ditangou *et al.*, 2000).

Além de flavonóides, fitormônios, incluindo auxinas, citocininas e etileno são produzidos por fungos ectomicorrízicos. Muitos estudos indicam que mudanças no balanço de auxinas é um pré-requisito para a organogênese na micorríza. Assim, os fungos micorrízicos aumentam a proliferação de raízes laterais (Martil *et al.*, 2001).

O ácido 3-indolacético (IAA) restaura o crescimento de raízes laterais (Ditangou *et al.*, 2000) indicando efeitos antagônicos das hipofarinas e das auxinas. A presença de triptofano derivados da planta na rizosfera pode ser suficiente para que o fungo ectomicorrízico aumente a biosíntese de IAA. Algumas etapas morfogenéticas que controlam o desenvolvimento de micorrizas são reguladas pelo IAA fúngico. Embora o triptofano e/ou outros componentes do exudado das plantas induzem a produção de IAA no micélio rizosférico, a síntese desse composto deve ser altamente controlada por outros fatores. Os múltiplos sinais identificados (auxinas, alcalóides, citocininas, fenilglicoside, etc) confirmaram a complexa rede de sinais que controlam o desenvolvimento da simbiose. Esses sinais podem agir de uma maneira sinérgica (rutina/zeatina) ou de maneira antagônica (IAA/hipofarina). A percepção de sinais leva a indução na produção de produtos gênicos cuja expressão sustenta respostas fisiológicas e de desenvolvimento (proliferação de raízes laterais, alteração da ramificação de hifas) (Martil *et al.*, 2001).

A proliferação de raízes e de tecidos fúngicos e a necessidade de se adaptar a uma mudança rápida do ambiente requerem uma variedade de proteínas (Martin *et al.*, 2001). Assim, a série de eventos que engloba o estabelecimento da associação ECM é

mediada por mudanças na expressão de vários genes no fungo e na planta como a proporção de proteínas reguladas durante a simbiose (Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005).

Análises de padrões de expressão gênica durante a formação de ectomicorrizas por meio do desenvolvimento de novas abordagens, tais como a determinação de perfis de transcrição e a hibridização diferencial de arranjos de cDNA, permitem a caracterização de genes das plantas e dos fungos com expressão diferencial durante a formação de ectomicorrizas (Le Quéré *et al.*, 2005).

Em uma pesquisa onde foi relatado o desenvolvimento da associação ectomicorrízica entre *Eucalyptus* e *Pisolithus*, mais de 15% dos transcritos correspondem a genes com expressão diferencial durante o desenvolvimento da simbiose, mas não foram detectados genes específicos da ectomicorriza. Isto sugere que o contato entre a planta e o fungo não aciona um gene específico, mas sim estimula ou reprime vários genes das células da raiz e do fungo (Voiblet *et al.*, 2001). Também tem sido estudada a expressão de genes que promovem o crescimento celular, o metabolismo primário, a diferenciação e a sinalização durante a formação e diferenciação ectomicorrízica (Nehls *et al.*, 2001a; Tagu *et al.*, 2003; Sundaram *et al.*, 2004; Zaretsky *et al.*, 2006).

Outros estudos sobre a expressão gênica durante o estabelecimento da simbiose ectomicorrízica tem revelado um grande número de genes que são regulados de maneira bastante sutil nas interações *Amanita/Populus* (Nehls *et al.*, 2001b), *Laccaria bicolor/Pinus resinosa* (Podila *et al.*, 2002), *Terfezia boudieri/Cistus incanus* (Zaretsky *et al.*, 2006), *Lactarius quietus/Quercus petraea* (Courty *et al.*, 2008), *Hydnangium/E. grandis* (Coelho *et al.*, 2010), entre outros. Estudos têm também identificado genes de fungos ectomicorrízicos que não apresentam identidade com as sequências no banco de dados NCBI (Podila *et al.*, 2002). Foi sugerido que esses genes podem ser específicos do fungo ectomicorrízico ou podem representar transcritos raros que não tenham sido identificados e caracterizados anteriormente (Podila *et al.*, 2002; Zaretsky *et al.*, 2006).

Com o progresso das ferramentas moleculares, tem sido observado um aumento exponencial de projetos de seqüenciamento de genomas. Atualmente encontram-se seqüenciados ou em andamento o genoma de 410 fungos (19 completados), dos quais 302 são ascomicetos e 77 basidiomicetos incluindo *Scleroderma citrinum* (em

andamento). Desses projetos, aproximadamente 13% tem como objetivo explorar a diversidade genômica de fungos micorrízicos, para entender a evolução e função da simbiose (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>; <http://genome.jgipsf.org/programs/fungi/index.jsf>).

Embora existam estudos genéticos, moleculares e de sequenciamento de genomas de fungos ectomicorrízicos, poucas moléculas de sinalização, genes e proteínas relacionadas a essas associações têm sido identificadas. Voiblet *et al.* (2001) demonstraram que os genes envolvidos nas vias de transdução de sinais estão entre os mais abundantes (13% dos mRNAs) em tecidos ectomicorrízicos. Eles correspondem às subunidades de proteínas G, proteína quinases e proteínas de ligação ao cálcio.

Uma proteína G fúngica, a proteína Ras, teve sua expressão particularmente estimulada nas ectomicorrizas formadas entre *Eucalyptus* e *Pisolithus* (Duplessis *et al.*, 2004). Um cDNA do gene *ras* foi descrito para o fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* e pode estar relacionado com o controle do crescimento celular e proliferação das hifas (Sundaram *et al.*, 2001).

É sabido que fungos ectomicorrízicos sintetizam e excretam auxinas (Martin *et al.*, 2001; Ditengou *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2000). Essas moléculas servem como sinais morfogênicos muito potentes para desenvolvimento das raízes (Martin *et al.*, 2001). Em concentrações baixas, elas aumentam o crescimento radicular e estimulam a formação de novos meristemas e de raízes laterais. Essas raízes laterais são novos alvos para colonização por hifas ectomicorrízicas.

Hipaforina, derivada do triptofano, é uma molécula altamente acumulada nas células das hifas de *Pisolithus* sp. em contato com as raízes de eucalipto, capaz de estimular a expressão de genes regulados por auxinas na planta. Dados recentes indicam que a hipaforina atua como antagonista de auxinas, paralisando o alongamento dos pelos radiculares. Polipeptídeos da parede celular como SRAP-32 (*Symbiosis Regulated Acidic Polypeptides*) e hidrofobinas, são sintetizados durante o estabelecimento da associação ectomicorrízica entre *Pisolithus* sp.-*Eucalyptus* sp. e as manoproteínas gp95 e gp72 da parede celular do fungo são reprimidas durante a associação (Tagu *et al.*, 2002).

Pesquisas realizadas sobre expressão gênica em fungos micorrízicos durante a fase de pré-simbiótica revelaram a indução de vários genes relacionados à atividade

mitocondrial. Além disso, foi observado aumento na taxa de respiração e no número de mitocôndrias nesses fungos (Valot *et al.*, 2005). Genes que codificam proteínas do canal de potássio e ATPase, com função na regulação de fluxo de íons para sinalização, foram expressos na associação entre *Laccaria bicolor* e *Pinus resinosa* (Podila *et al.*, 2002).

Coelho *et al.* (2010) construíram uma biblioteca subtrativa de cDNA para avaliar a expressão de genes do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica da associação com *E. grandis*. Na pesquisa foram identificados genes relacionados ao metabolismo energético, como o gene que codifica ATP sintase. A expressão desse gene foi avaliada pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR), sendo observado aumento na expressão no micélio de *Hydnangium* sp. cultivado na presença da planta, confirmando a ativação de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial nessa fase da associação.

Aos sete dias de contato entre *Pisolithus microcarpus* e *E. globulus* houve aumento na expressão de genes envolvidos na atividade mitocondrial (subunidades da ATP sintase, malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, entre outros) (Duplessis *et al.*, 2005). A quantidade de ATP sintase pode variar de acordo com o estado metabólico das células (Paumard *et al.*, 2002). Durante a fase pré-simbiótica, as subunidades detectadas da ATP sintase, podem fornecer o ATP necessário para sustentar as funções dependentes de energia durante a associação micorrízica (Ezawa *et al.*, 2002; Ferrol *et al.*, 2002, Valot *et al.*, 2005).

Outro estudo realizado por Besserer *et al.* (2009) demonstrou a importância da síntese de ATP para o desenvolvimento do fungo sendo observada uma redução parcial na ramificação de hifas quando a síntese de ATP foi inibida. Durante a formação do manto e da Rede de Hartig, na interação ectomicorrízica entre *Betula pendula* e *Paxillus involutus*, também foi observado aumento na expressão de genes relacionados com a cadeia respiratória, como o gene da ATP sintase (Le Quére *et al.*, 2005). Análises estruturais das hifas que formam a Rede de Hartig têm revelado alto número de mitocôndrias. A ativação da cadeia respiratória deve estar conectada com a ativação do metabolismo de carboidratos ao longo do ciclo do ácido cítrico (Massicotte *et al.*, 1987; Smith e Read, 1997).

Para poder compreender a comunicação célula a célula nas associações ectomicorrízicas, é requerida a identificação dos componentes genéticos envolvidos neste processo. O inventário de genes com expressão diferencial, de mRNA (transcriptoma), de polipeptídeos (proteoma) ou de metabólitos (metaboloma) nos tecidos ectomicorrízicos pode representar pontos de partida para análises mais aprofundadas das funções dessas possíveis moléculas de sinalização, genes ou proteínas regulados na simbiose. Assim, o estabelecimento de mapas genéticos de fungos ECM é necessário para a compreensão dos componentes genéticos destes organismos (Martin *et al.*, 2008).

Ainda não foi sequenciado o genoma completo de espécies de *Scleroderma* e até hoje poucos genes foram caracterizados para esse fungo. Tampouco existem pesquisas sobre a regulação da expressão de genes regulados durante as associações ectomicorrízicas com espécies desse gênero.

A identificação e caracterização de genes expressos, como o gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. leave*, na interação com *E. grandis*, é um passo importante para o futuro entendimento da regulação e do papel desse gene no desenvolvimento da simbiose. Este tipo de pesquisas irá auxiliar na compreensão da base molecular e dos mecanismos envolvidos na interação planta-fungo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Genética Molecular de Microorganismos e de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Organismos e condições de cultivo

Para a obtenção de ectomicorrizas entre o fungo e plântulas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden (Figura 1a), foi utilizado o isolado Scl08 originário de Guanhães-MG (hospedeiro *E. grandis*), da coleção de culturas do Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa identificado como *Scleroderma laeve* Lloyd emend Guzmán (Figura 1b).

A identificação do fungo foi feita com base nas características morfológicas e biométricas do basidioma e basidiósporos, conforme Guzmán (1970) (Material examinado: *Scleroderma laeve* Lloyd emend. Guzmán, 27/02/2008, Ganhães, MG, Mariane Paludetti Zubieta, Irene da Silva Coelho, Fábio Teixeira Delazari, Maria Catarina Megumi Kasuya e Gilson Santos Gaudereto-VIC 31604).

As culturas do fungo foram mantidas a 28 °C em placas de Petri, contendo meio de cultivo Melin Norkrans (MNM) (Marx, 1969), com transferência periódica (30 dias) para novo meio de cultura.

3.2. Desinfestação das sementes e obtenção de plântulas de *Eucalyptus grandis*

Sementes de *Eucalyptus grandis* foram desinfetadas por um minuto em etanol 70 %, enxaguadas com água destilada estéril, imersas por seis minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 % (200 ml por litro) e novamente enxaguadas com água destilada estéril. Posteriormente, para a sua germinação, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo meio MNM modificado (Burgess *et al.*, 1996), coberto com filtro de papel celofane autoclavado. As placas foram seladas em torno das bordas com filme plástico para evitar contaminação e incubadas em incubadora B.O.D a 28 °C por três dias.

3.3. Estabelecimento da associação ectomicorrízica entre *Scleroderma laeve* e *Eucalyptus grandis* utilizando a micorrização *in vitro*

O sistema de micorrização *in vitro* foi baseado na metodologia descrita por Burgess *et al.* (1996), com modificações. Para cada uma das fases (pré-simbiótica, colonização, diferenciação e funcionamento), foram realizadas triplicatas dos experimentos e controles da planta e do micélio fúngico foram mantidos em condições similares. As amostras controle e do tecido ECM foram coletadas e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior extração de RNA total.

Para monitorar e definir as diferentes fases da associação ectomicorrízica foram realizados cortes das amostras a cada três dias, até completar 30 dias de contato entre a planta e o fungo. Amostras das raízes foram cortadas e fixadas com FAA 5:90:5 (formaldeído:etanol:ácido acético). Após 24 h, o FAA foi retirado e as raízes foram deixadas por três horas em álcool etílico com diluições graduais (50%, 60% e 70%). As raízes fixadas com álcool 70% foram colocadas em tampão fosfato 0,1 M, contendo sacarose 10% (100 gm por litro) por no mínimo uma hora. Em seguida, o material foi utilizado para obtenção de cortes transversais de aproximadamente 18 µm com auxílio de criomicrotomo LEICA CM1850. Os cortes foram corados com azul de tripano e analisados sob lupa Olympus SZ2-ILA e em microscópio Olympus BX50. As imagens foram capturadas utilizando-se o software Q-color 3 (Olympus latin America Inc.).

3.3.1. Fase pré-simbiótica

Após a germinação das sementes e obtenção das plântulas, sete plântulas foram transferidas para cada placa de Petri contendo meio MNM modificado (Burguess *et al.*, 1996), cobrindo cerca da metade da placa facilitando o crescimento vertical das plântulas. As placas foram deixadas em câmara de crescimento inclinadas com um ângulo de aproximadamente 70°, com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹. Após três dias de crescimento, as raízes das plântulas foram cobertas com papel celofane autoclavado cobrindo cerca da metade da placa com meio de cultivo e inoculadas com cinco discos de meio de cultivo contendo micélio, removidos das bordas de colônias de *Scleroderma laeve* cultivado por 30 dias em meio MNM a 28 °C (Figura 1). As placas foram seladas em torno das bordas com filme plástico e transferidas para a câmara de crescimento. Após 30 dias de incubação (com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 16h e sob intensidade luminosa de 20 μmol m⁻²s⁻¹), os tecidos ectomicorrízicos foram coletados e armazenados a -80 °C. Também foram coletadas e fixadas amostras das raízes para cortes em criomicrotomo. Placas de Petri contendo plantas sem inóculo foram mantidas nas mesmas condições.

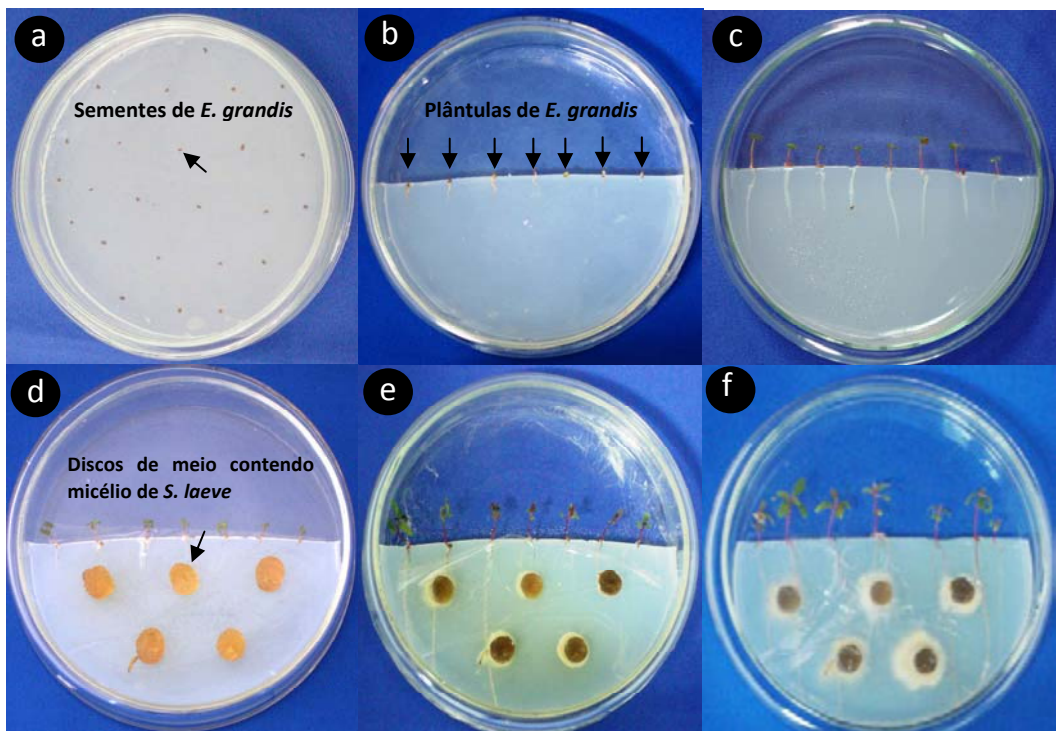


Figura 1. Sistema de micorrização *in vitro* para a fase pré-simbiótica. Sementes de *Eucalyptus grandis* colocadas sobre meio de síntese após a desinfestação (a). Plântulas de *E. grandis*, um dia (b) e três dias após transferência para meio de cultivo (c). Plântulas de *E. grandis* com três dias após transferência e logo inoculadas com *Scleroderma laeve* Lloyd (d), 15 (e) e 30 dias após inoculação (f).

3.3.2. Fases de colonização, diferenciação e funcionamento

Foram transferidos discos de meio de cultivo contendo micélio, removidos das bordas de colônias de *S. laeve*, cultivadas por 30 dias em meio MNM a 28 °C para novas placas de Petri contendo meio MNM modificado (Burgess *et al.*, 1996) coberto com papel celofane. As placas foram incubadas novamente a 28 °C durante 20 dias. Após a germinação das sementes, foram colocadas aproximadamente quatro plântulas ao redor de cada disco de ágar contendo o micélio fúngico em crescimento. As placas foram transferidas para câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 °C \pm 2 °C, com fotoperíodo de 16 h sob intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Com base aos resultados obtidos dos cortes em criomictótomo a cada três dias foram identificadas as fases de colonização (três dias), diferenciação (15 dias) e funcionamento (30 dias). Assim, após três, 15 e 30 dias de contato entre as plantas e o fungo, os tecidos ectomicorrízicos foram coletados e armazenados a -80 °C (Figura 2). Também foram coletadas e fixadas amostras das raízes para cortes em criomicrotomo.

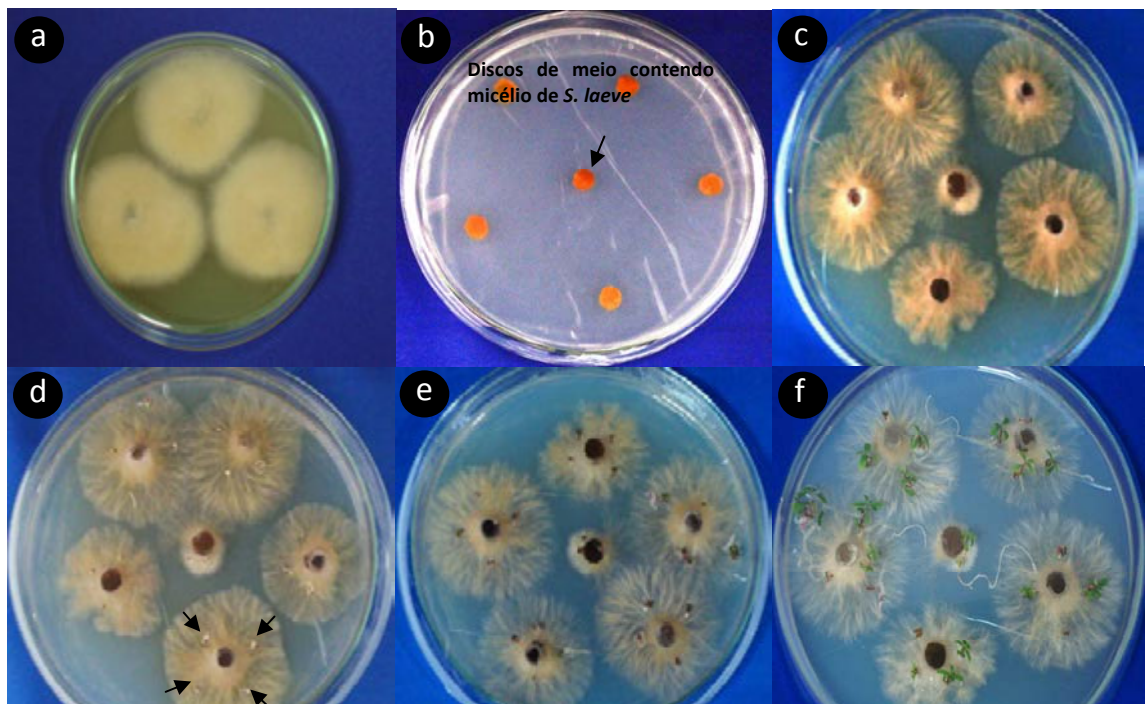


Figura 2. Sistema de micorrização *in vitro* das fases de colonização, diferenciação e funcionamento. Micélio do fungo *Scleroderma laeve* cultivado por 30 dias em meio MNM (a). Discos de ágar contendo micélio do fungo *S. laeve* cultivados em placas de petri contendo meio de cultivo MNM modificado coberto com filtro de papel celofane (b). Micélio do fungo *S. laeve* cultivado por 20 dias em placas de petri contendo meio de cultivo MNM modificado coberto com filtro de papel celofane (c). Plântulas de *E. grandis* e *S. laeve* Três dias após contato (colonização) (d); 15 dias de contato (diferenciação) (e), e 30 dias de contato (funcionamento) (f).

3.4. Amplificação e caracterização da sequência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *Scleroderma laeve*

A extração do DNA total do micélio fúngico coletado após 30 dias de crescimento em meio MNM e em MNM modificado, foi feita de acordo Speach *et al.*, (1982). A quantidade de DNA foi determinada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000), a 260 nm e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio. As bandas foram observadas sob transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada utilizando o sistema de imagens Eagle-Eye™ (Stratagene, La Jolla, CA, USA). O DNA total de *E. grandis* foi extraído com o DNeasy Plant kit da (QIAGEN, USA).

Para isolar a sequência do gene que codifica ATP sintase de *S. laeve*, foram feitas buscas nos bancos de dados de sequências de organismos taxonomicamente próximos a *S. laeve* utilizando-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Com essas sequências, foram feitos alinhamentos utilizando-se o programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007), por meio da ferramenta Clustal W (Thomson *et al.*, 1994). Os oligonucleotídeos foram construídos com o auxílio do programa PRIMER 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) visando à amplificação de uma região do gene que codifica a subunidade 6 de ATP sintase em *S. laeve*.

A amplificação foi executada em uma mistura de reação contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (*ATPsint-L* 5'-CGAAATTATTACCTTCAAATGGTC-3' e *ATPsint-R* 5'-TCCTGTAATAGCTAAGAATAATGCAAA-3'), 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado (dNTP), 2 mM de MgCl₂, Buffer Go taq Flexi Promega 1X e 1 unidade de Go Taq Flexi Promega (Promega, Madison, USA). As condições de amplificação foram: 1 min a 95 °C (desnaturação), seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C, finalizando com um passo de 5 min a 72 °C (elongação final).

O produto da PCR, avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2 % apresentou um fragmento de DNA de 503 pb, que foi purificado utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System da PROMEGA (PROMEGA USA 2010) e seqüenciado utilizando o seqüenciador automático 3730XL (<http://www.macrogen.com>). A sequência foi comparada com sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o algoritmo BLASTX. O programa BLASTX compara os possíveis produtos da tradução de uma seqüência de nucleotídeos submetida com seqüências de aminoácidos depositadas no banco de dados. A identidade foi considerada significativa quando o valor *e* foi inferior a 10^{-4} .

O produto final da PCR foi caracterizado como sendo parte do gene que codifica a subunidade seis da ATP sintase e que foi expresso no fungo *S. laeve* durante as diferentes fases da associação ectomicorrizica com *E. grandis*.

3.5. Clonagem e sequenciamento do produto da PCR .

Os fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA total extraído do micélio de *S. laeve* foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Células ultracompetentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas com a reação de ligação de acordo com Inoue *et al.* (1990). As bactérias transformantes foram obtidas em meio Luria Bertani (Sambrook *et al.*, 1989) sólido contendo ampicilina (50 μ g/mL) e Isopropil- β -D-tiogalactosidase (X-gal. Promega, Madison WI, EUA). Para se verificar o tamanho dos fragmentos de DNA clonados no vetor pGEM, colônias de bactérias transformantes foram transferidas para microtubos de 500 μ l com palito estéril. Em cada tubo foram adicionados 40 μ l de solução de lise (TrisHCl 1M pH 8, EDTA pH 8, NaOH 5M, SDS 25%) (Sambrook & Russell, 2001) , seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foram adicionados 3 μ l de HCl 1 M e 53 μ l de azul de bromofenol. Os tubos foram deixados a -80 °C por 20 min e centrifugados a 16.000 rpm por três min.

O sobrenadante foi aplicado em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio (2,5 ml por litro) e os fragmentos de DNA separados por eletroforese em tampão TBE 1X. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada utilizando-se o sistema de imagens Eagle-Eye™ (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Foram escolhidas as colônias que apresentaram bandas de maior tamanho, indicadoras da presença do inserto. Essas colônias foram cultivadas "overnight" em meio Luria Bertani líquido em banho Maria a 37 °C. O DNA plasmidial foi extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System da PROMEGA (PROMEGA, USA) e sequenciado utilizando os oligonucleotídeos **M13F 5'**

GTAAAACGACGGCCAGT-3' e **M13R** 5'-GCGGATAACAATTTACACACAGG-3' e o seqüenciador automático 3730XL (<http://www.macrogen.com>).

As seqüências obtidas foram submetidas ao programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) para retirada das seqüências provenientes do vetor. Após esse procedimento, as seqüências foram comparadas com seqüências depositadas nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1997).

3.6. Extração de RNA total do micélio de *Scleroderma laeve* das ectomicorrizas e de *Eucalyptus grandis* e avaliação da expressão do gene que codifica a subunidade seis ATP sintase por RT-PCR

Para investigar a regulação de genes ativados durante o desenvolvimentos das ectomicorrizas é preciso um sistema modelo onde seja possível avaliar a expressão de genes do fungo. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema *in vitro* com o objetivo de isolar e analisar o gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase no fungo *S. laeve* durante a interação simbiótica com *E. grandis*. Com este sistema *in vitro* foi possível estudar a expressão gênica no fungo ectomicorrízico durante o estado de vida livre e no desenvolvimento e estabelecimento da ectomicorriza.

A análise da expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve*, cultivado na presença das raízes da planta hospedeira em relação ao fungo cultivado em vida livre, foi avaliada pela técnica de reação de polimerase em cadeia em transcrição reversa (RT-PCR) nas diferentes fases da associação. O gene que codifica a subunidade ribossomal 17S de *S. laeve* foi utilizado para mostrar a homogeneidade entre as amostras de RNA total, uma vez que a expressão desse gene não varia durante os tempos analisados.

Com o objetivo de estudar a expressão desse gene na fase pré-simbiótica da formação de ectomicorrizas, plântulas de *E. grandis* foram separadas do micélio de *S. laeve* por um filtro de papel celofane por meio da técnica de micorrização *in vitro*, não houve contacto físico entre os simbiossitos permitindo apenas a passagem de compostos liberados por ambos, simulando a fase pré-simbiótica (Coelho *et al.*, 2010).

Para realizar a RT-PCR, nas diferentes fases da micorrização após o contato inicial entre *S. laeve* e *E. grandis* foram coletados tecido das ectomicorrizas. Também foram coletados tecidos das raízes das plantas e micélio do fungo nessas fases, com a finalidade de detectar o gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve*. Após a coleta o material foi congelado em nitrogênio líquido para a extração de RNA total baseada na metodologia descrita por Chan *et al.*, (1993). A quantidade de RNA total foi determinada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000), a 260 nm e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e a imagem digitalizada utilizando o sistema de imagens Eagle-Eye™ (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Para purificação das amostras de RNA total extraído, essas foram tratadas com DNase (RQ1 RNase-Free DNase promega). A detecção do transcrito foi conduzida utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System da Promega (PROMEGA, USA, 2010). O controle endógeno utilizado foi o gene que codifica a subunidade ribossomal 17S relacionando a diferente concentração de RNA total das amostras, para correção de variações de amplificação devida as variações nas quantidades de material inicial presente nas amostras, as variações nas condições de processamento e à presença de inibidores de PCR.

3.7. Análise filogenética do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em Basidiomicetos

A sequência do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *Scleroderma laeve* foi comparada com as sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1997). As sequências que apresentaram menor valor *e* (expectation value, e-value) foram exportadas em formato FASTA (Tabela 1). Foi realizado alinhamento das sequências com o programa MEGA 4, utilizando-se a ferramenta clustalW. Para a análise filogenética, foi utilizado o método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-Joining- NJ) no programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Para a análise das sequências protéicas, foi utilizada a base de dados de Domínios Conservados do NCBI (CDD). Essa ferramenta permite a

identificação de domínios conservados e sítios funcionais em sequências protéicas (Marchler-Bauer *et al.*, 2010).

Tabela 1. Fungos Basidiomicetos utilizados na análise filogenética das sequências de aminoácidos do gene que codifica a subunidade seis da ATP sintase

Organismo	Número de acesso (GenBank)	Classificação (Ordem-Família)
<i>Scleroderma laeve</i>	AAD26683.1	Boletales-Sclerodermataceae
<i>Scleroderma hypogaeum</i>	AAD26684.1	Boletales-Sclerodermataceae
<i>Pisolithus arhizus</i>	AAD26682.1	Boletales-Sclerodermataceae
<i>Gyroporus cyanescens</i>	AAD26685.1	Boletales-Gyroporaceae
<i>Boletinellus merulioides</i>	AAD26680.1	Boletales-Boletinellaceae
<i>Phlebopus portentosus</i>	AAD26679.1	Boletales-Boletinellaceae
<i>Gyrodont lividus</i>	AAD26681.1	Boletales-Gyrodontaceae
<i>Paxillus filamentosus</i>	AAD26672.1	Boletales-Paxillaceae
<i>Paxillus vernalis</i>	ABG02563.1	Boletales-Paxillaceae
<i>Paxillus involutus</i>	AAD26673.1	Boletales-Paxillaceae
<i>Suillus luteus</i>	AAD02891.1	Boletales-Suillaceae
<i>Suillus granulatus</i>	AAD02893.1	Boletales-Suillaceae
<i>Calostoma cinnabarinum</i>	ABG02556.1	Boletales-Calostomataceae
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	AAD26677.1	Boletales-Hygrophoropsidaceae
<i>Boletus pallidus</i>	AAD02898.1	Boletales-Boletaceae
<i>Boletus frostii</i>	ADR77702.1	Boletales-Boletaceae
<i>Boletus pallidroseus</i>	ADR77706.1	Boletales-Boletaceae
<i>Boletellus exiguus</i>	ADR77708.1	Boletales-Boletaceae
<i>Boletellus dicymbophilus</i>	ADR77699.1	Boletales-Boletaceae
<i>Oligoporus rennyi</i>	ABB69030.1	Polyporales-Polyporaceae
<i>Polyporus squamosus</i>	ABB69033.1	Polyporales-Polyporaceae
<i>Ganoderma tsugae</i>	ACA63357.1	Polyporales-Ganodermataceae
<i>Veluticeps berkeleyi</i>	ADV17876.1	Gloeophyllales-Gloeophyllaceae

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese *in vitro* e avaliação morfológica das ectomicorrizas

A técnica de micorrização *in vitro* foi eficiente para a obtenção de ectomicorrizas entre *S. laeve* e *E. grandis* nas diferentes fases da associação. Neste sistema, a formação de ectomicorriza inicia-se ao 3º dia de contato, a diferenciação ao 15º e ao 30º dia há a formação completa e funcionamento da ectomicorriza.

O número de raízes laterais era maior em plântulas de *E. grandis* em contato com *S. laeve* durante a fase de pré-simbiótica em relação às plântulas não-inoculadas (figura 3). O resultado indica o envolvimento de moléculas secretadas pelo fungo (Figuras 3a e 3d). A indução da formação de raízes curtas na fase pré-simbiótica também foi observada por Coelho *et al.* (2010). Como as plantas não se encontravam em contato direto com o fungo, não houve formação do manto fúngico nem da rede de Hartig (Figura 3f).

A base molecular dos processos envolvidos na fase pré-simbiótica não está elucidada, mas sabe-se que ocorre alteração nas vias que são reguladas por auxinas. A ação de moléculas secretadas por fungos como hipaforinas, que são antagonistas ao ácido indolacético, inibem o desenvolvimento de pêlos radiculares (Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2007). Essas moléculas, secretadas por fungos ectomicorrízicos como *Pisolithus*, são capazes de estimular a formação de raízes curtas na planta hospedeira, possivelmente atuando como antagonista de auxinas da planta impedindo o alongamento dos pelos radiculares (Ditengou *et al.*, 2000; Kawano *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001).

Durante essa fase, compostos produzidos pelos simbiontes elicitam respostas fisiológicas e genéticas que levam à determinação da compatibilidade da simbiose (Martin *et al.*, 2001). Como os sinais liberados pelos simbiontes ectomicorrízicos são propagados nos parceiros e como esses processos desencadeiam a expressão de genes que auxiliam no reconhecimento dos parceiros e na formação de tecidos simbióticos regulados pela simbiose, são questões que estão apenas começando a ser compreendidas. É necessária a identificação de genes cuja expressão é alterada durante o desenvolvimento das ECM para facilitar a compreensão desse processo de troca de sinais.

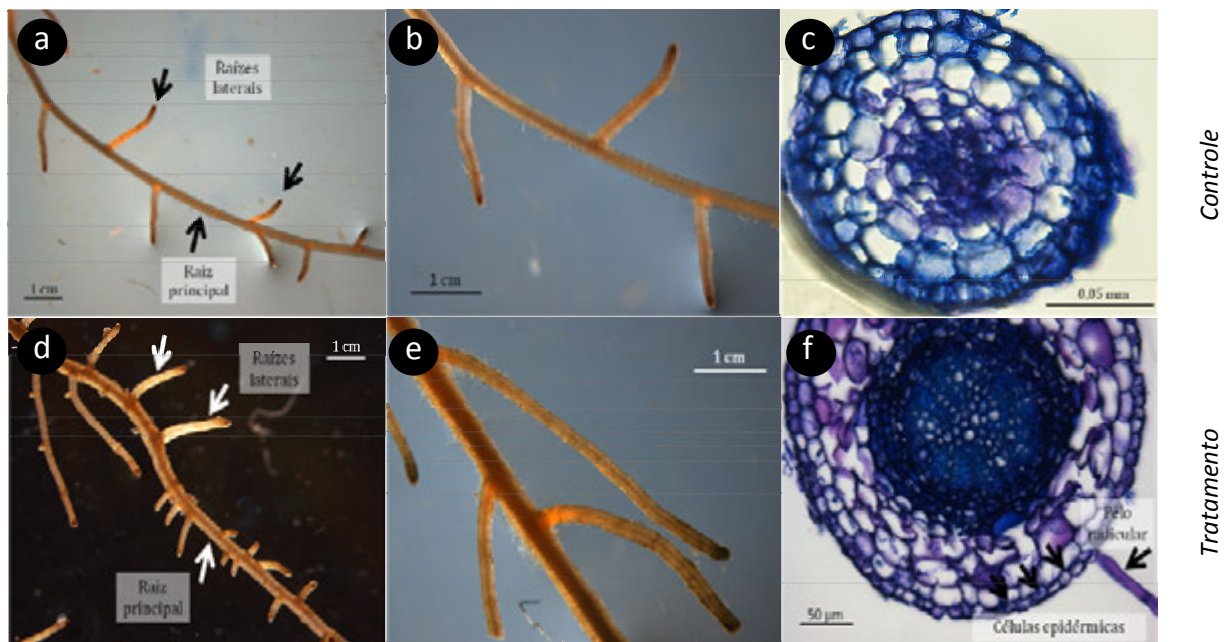


Figura 3. Mudanças morfológicas durante a fase pré-simbiótica da micorrização *in vitro* entre plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Scleroderma laeve*. Raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado (controle) mostrando o desenvolvimento das raízes laterais (a), (b). Corte transversal da raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado (c). Raiz de *E. grandis* após

30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado, coberta com papel celofane e inoculada com *S. laeve* mostrando o desenvolvimento das raízes laterais **(d)**, **(e)**. Corte transversal da raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado, coberta com papel celofane e inoculada com *S. laeve* **(f)**.

Após a fase de pré-infeção, a hifa alcança a superfície da raiz, tornando-se mais ramificada. Nos primeiros dias de contato entre *S. laeve* e *E. grandis*, as hifas fúngicas colonizaram a superfície da raiz (Figura 4).

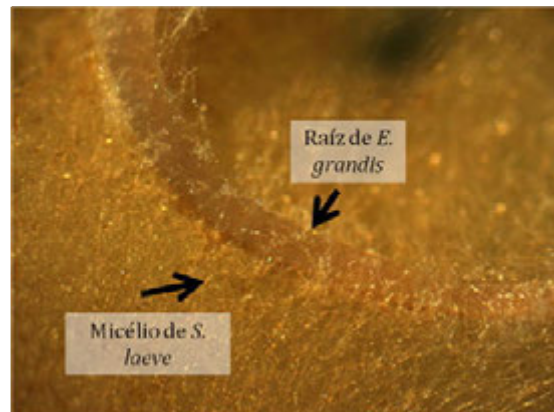


Figura 4. Hifas fúngicas de *Scleroderma laeve* colonizando a superfície de raiz de *Eucalyptus grandis* aos dois dias de contato.

No terceiro dia de contato entre *S. laeve* e *E. grandis*, foi observada a presença do manto fúngico (Figura 5f), caracterizando a fase de colonização. Não foi registrado o desenvolvimento de raízes laterais neste tempo (Figuras 6b e 6e), mas foi observado alongamento parcial das células epidérmicas (Figura 6c). A associação com *S. laeve* resultou em aumento do número de raízes laterais em plântulas de *E. grandis* durante as fases de diferenciação e funcionamento (Figuras 6a, 6d, 7a e 7d).

Durante os 10 primeiros dias, as plântulas não-inoculadas produziram menos de duas raízes laterais por plântula. Durante o mesmo período, as plântulas mantidas na presença do fungo produziram mais de cinco raízes laterais por plântula. É sabido que espécies de crescimento rápido, como o eucalipto, germinam com três dias e produzem raízes laterais com 10 dias (Malajczuk *et al.*, 1990; Burgess *et al.*, 1994). A emergência de raízes laterais foi significativamente estimulada aos 15 e 30 dias de contato com o fungo (Figuras 6a, 6d, 7a e 7d). O efeito da presença do fungo micorrízico sobre a emergência de raízes laterais já havia sido demonstrado, quando plântulas de *Eucalyptus* e *Pinus* não inoculadas foram colocadas sobre colônias de certos fungos ectomicorrízicos como *Pisolithus* e *Laccaria* (Malajczuk *et al.* 1990).

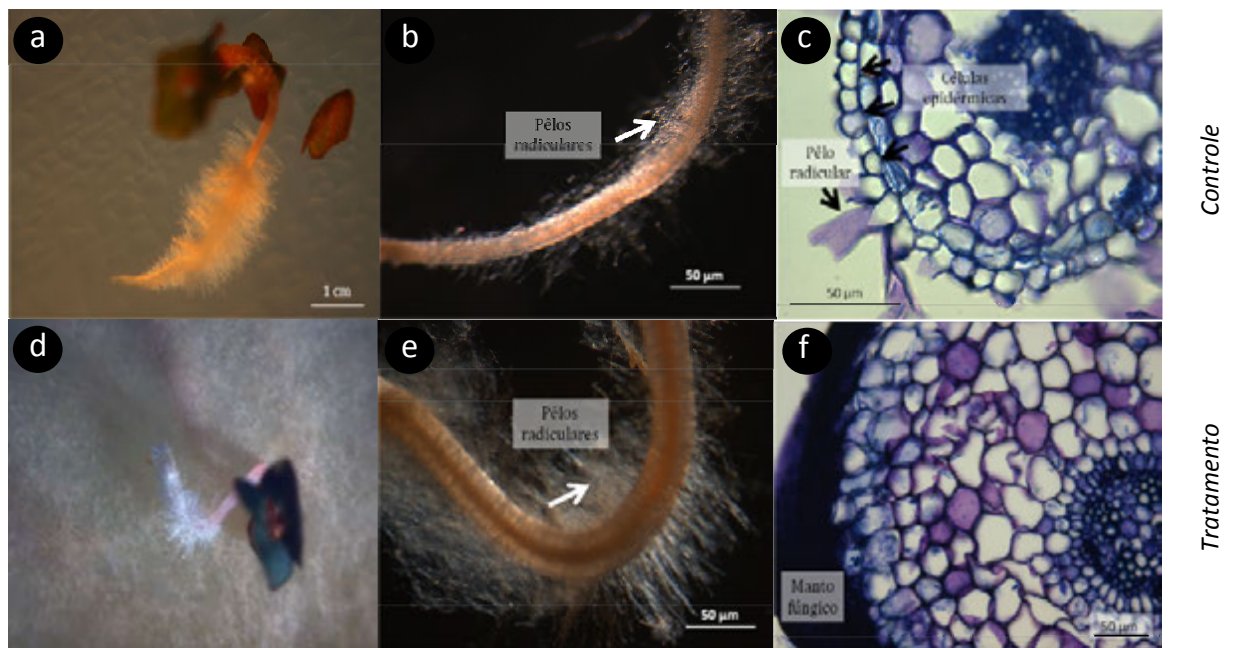


Figura 5. Mudanças morfológicas durante a fase de colonização da micorrização *in vitro* entre plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Scleroderma laeve*. Raiz de *E. grandis* após três dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle) (a), (b). Corte

transversal de raiz de *E. grandis* após três dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c). Raiz de *E. grandis* após três dias de contato com micélio de *S. laeve* (d),(e). Corte transversal de raiz de *E. grandis* após três dias de contato com micélio de *S. laeve* mostrando o desenvolvimento do manto (f).

Brun *et al.* (1995) utilizaram um sistema *in vitro* para formar ectomicorrizas entre *Betula* e *Paxillus*. Naquele sistema, as raízes foram desenvolvidas antes da inoculação com o fungo. Conseqüentemente, as ectomicorrizas examinadas eram uma mistura de raízes que surgiram antes da inoculação, raízes posteriormente colonizadas e raízes de diferentes idades que emergiram após a inoculação. Portanto, estudar os principais eventos do desenvolvimento associados à formação de simbiose nesses sistemas é difícil (Burgess *et al.*, 1996).

Em outros sistemas onde o inóculo fúngico é geralmente introduzido no sistema radicular pré-desenvolvido, este tipo de sistema radicular é composto de raízes laterais em diversos estágios fisiológicos. Por isto, nem todas as raízes laterais tem contato com as hifas no momento em que os simbiontes são justapostos (Burgess *et al.*, 1994). Burgess *et al.* (1996) descreveram um sistema de micorrização *in vitro* onde foi sincronizada a emergência de raízes laterais e o desenvolvimento das ectomicorrizas. Essa técnica foi desenvolvida para facilitar estudos das alterações moleculares e bioquímicas ocorridas durante a formação das ectomicorrizas.

O sistema de micorrização *in vitro* baseado na técnica desenvolvida por Burgess *et al.* (1996) utilizada nesta pesquisa, permitiu a obtenção de ectomicorrizas entre *S. laeve* e *E. grandis*. Essas ectomicorrizas foram caracterizadas pela ausência de pêlos radiculares, aumento no número de raízes laterais, formação do manto fúngico e da Rede de Hartig (Figuras 5, 6 e 7), que rodeia intercelularmente as células da epiderme em *Eucalyptus*, causando o alongamento das mesmas.

Dexheimer *et al.* (1994) demonstraram que o ápice da raiz principal pode tornar-se micorrízico em sistemas horizontais *in vitro*, mas não em sistemas verticais. No entanto, as seções transversais de raízes primárias mostram a presença de pêlos radiculares aprisionados pelas hifas do fungo, epiderme colapsada e falta de

alongamento nas células epidérmicas (Dexheimer *et al.*, 1994; Martin & Tagu, 1995). No presente estudo, as ectomicorrizas foram desenvolvidas somente nas raízes laterais, as hifas proliferaram ao redor das raízes primárias, mas não foi formada uma Rede de Hartig típica como foi registrado por Burgess *et al.* (1996) na associação ectomicorrízica *Pisolithus-E. grandis*.

As hifas fúngicas envolveram a raiz primária e aproximadamente no décimo quinto dia colonizaram intercelularmente as células da epiderme, as quais estavam completamente alongadas. Somente células epidérmicas novas, formadas após a invasão fúngica, estão envolvidas neste processo de colonização. A Rede de Hartig (rede de hifas intercelulares) se desenvolve apenas entre as células epidérmicas que passam por um alongamento como resultado do contato com o fungo em *Eucalyptus* (Ditengou *et al.*, 2000). Houve formação completa do manto fúngico, dando se início ao desenvolvimento da Rede de Hartig (Figuras 6f).

A interação de raízes de plantas com fungos ectomicorrízicos pode influenciar a taxa de emergência e desenvolvimento de raízes laterais (Bolton *et al.*, 1992; Piola *et al.*, 1995). A germinação e o crescimento das plântulas na presença de hifas fúngicas, como no experimento feito por Burgess *et al.* (1996), tiveram como consequência direta um estímulo na produção de raízes laterais e uma redução no tamanho da raiz primária. Esses efeitos podem ser consequência da alteração do equilíbrio hormonal normal do hospedeiro, causada pelos fungos ectomicorrízicos (Gay *et al.*, 1994; Gea *et al.*, 1994; Gogala, 1991; Wong *et al.* 1989; Gogala, 1991). Houve aumento do número e tamanho das raízes laterais nas plântulas em contato com *S. laeve*, em comparação com às plântulas controle, depois de 15 dias de contato (Figuras 6a, 6b, 6d e 6e). A alteração nos padrões de emergência de raízes laterais e a redução da extensão da raiz primária nessas plântulas podem ser devidas à produção de auxinas pelo fungo.

No trigésimo dia, o número de raízes laterais nas plântulas de *E. grandis* em contato com o fungo era maior do que nas plântulas controle (Figuras 7a e 7d). Ocorreu alongamento das células da epiderme e engrossamento do manto (Figuras 7c e 7f). No sistema radicular das plântulas inoculadas, as raízes laterais que emergiam e ao mesmo tempo formavam as ectomicorrizas estavam livres de pelos radiculares (Figuras 7b e 7e), estavam totalmente envolvidas pelo micélio fúngico e possuíam uma Rede de Hartig completamente formada entre as células alongadas da epiderme (Figura 7c e 7f).

Compostos acumulados em fungos ectomicorrízicos como *P. tinctorius* causam forte redução na emergência de pêlos radiculares em *Eucalyptus*, sugerindo que moléculas secretadas pelo fungo podem prevenir o desenvolvimento de pêlos radiculares nas raízes laterais colonizadas. Essa inibição é possivelmente devida à síntese de moléculas secretadas pelo fungo, como as hipaforinas (Ditengou *et al.*, 2000; Reboutier *et al.*, 2002).

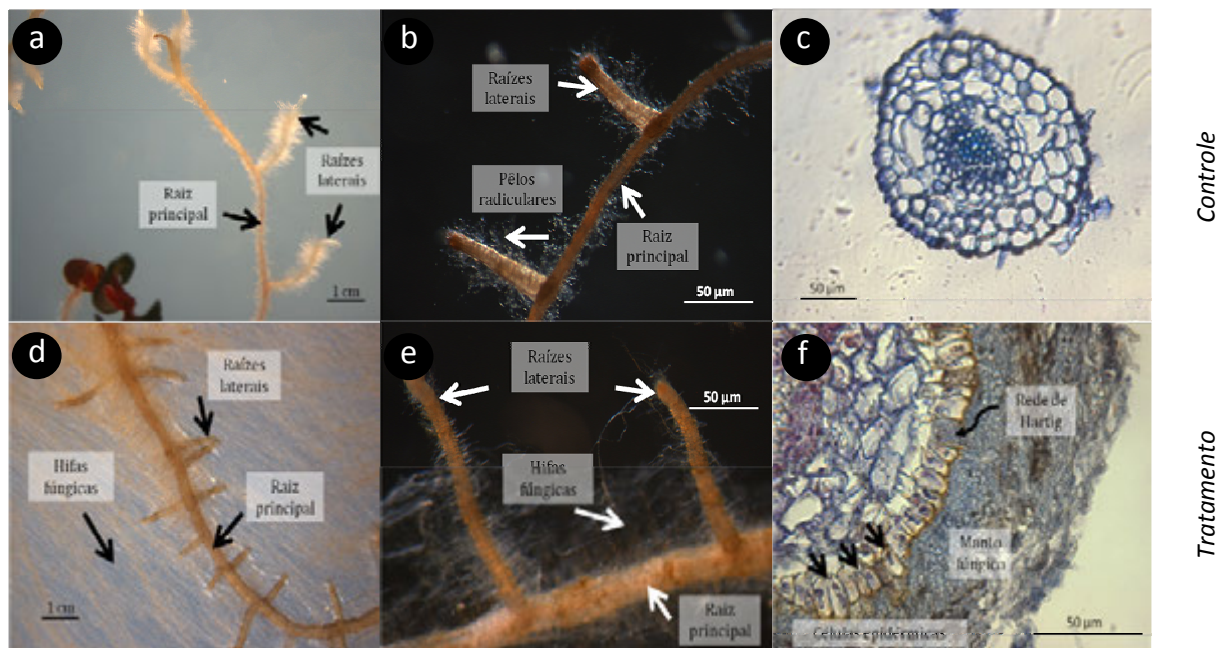


Figura 6. Mudanças morfológicas durante a fase de diferenciação da micorrização *in vitro* entre plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Scleroderma laeve*. Raiz de *E. grandis* após 15 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle), mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e a presença de pêlos radiculares (a), (b). Corte transversal de raiz de *E. grandis* após 15 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c). Raiz de *E. grandis* após 15 dias de contato com micélio de *S. laeve* mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e perda de pêlos radiculares (d), (e). Corte transversal de raiz de *E. grandis* após 15 dias de contato com micélio de *S. laeve* mostrando o desenvolvimento do manto (Ma). Hifas

começam a forçar a entrada entre algumas células da epiderme formando a Rede de Hartig (Rh) (f).

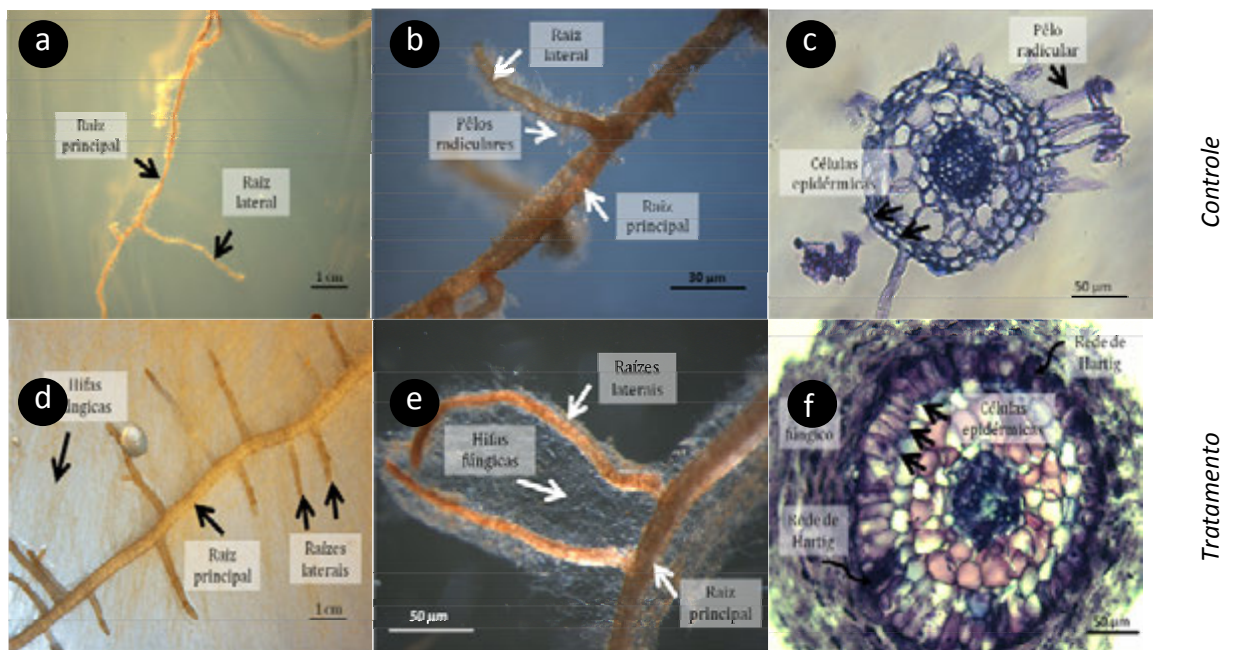


Figura 7. Mudanças morfológicas durante a fase de funcionamento da micorriзация *in vitro* entre plântulas de *Eucalyptus grandis* e *Scleroderma laeve*. Raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (controle) mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e a presença de pêlos radiculares (a), (b). Corte transversal de raiz de *E. grandis* após 30 dias de crescimento em placa de Petri contendo meio MNM modificado coberto com papel celofane (c). Raiz de *E. grandis* após 30 dias de contato com micélio de *S. laeve* (f).

mostrando o desenvolvimento das raízes laterais e perda de pêlos radiculares (d), (e). Corte transversal de raiz de *E. grandis* após 30 dias de contato com micélio de *S. laeve* mostrando o desenvolvimento do manto (Ma) e da Rede de Hartig (Rh) (f).

4.2. Amplificação e caracterização da sequência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *Scleroderma laeve*

Foi possível a amplificação e caracterização da sequência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase de *S. laeve*. Essa sequência possui 503 pb e não foi observada a presença de introns (Figura 9).

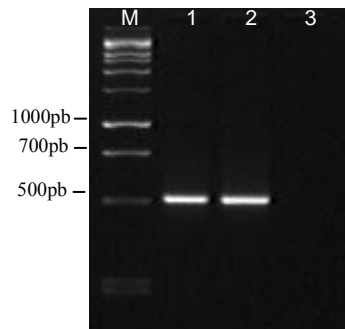


Figura 8. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação. Marcador 1kb, cDNA (1), DNA genômico de *Scleroderma laeve* (2) e controle negativo (3).

Foi obtida identidade significativa da sequência parcial do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve* com as sequências dos genes que codificam a subunidade seis de ATP sintase em *S. hypogaeum*, *Pisolithus arhizus*, *Gyroporus cyanescens*, entre outros. O alinhamento das sequências nucleotídicas desses genes também mostrou alta identidade, confirmando o parentesco entre esses organismos (Figura 10).

```

Scleroderma laeve      GCTCCTTTATTTGGTTATATAAGTTTCACTATTACTAATTTAGCATTATATGCTGGTATTATATTATCTATAATGTA
Scleroderma hypogaeum .....T.G.....T.....
Pisolithus arhizus    .....ATT.....TG.....A.A.....T.T..G.....
Gyroporus cyanescens  .....C.....T.A.....T.....T.....A.T..G.T...C..G

                                ATPsint-L →
Scleroderma laeve      RGTTTACATTTACTAGGAAATAATGATACGAAATTATTACCTTCAAATGGTCTATTCTATTGAAAGTTTCTTTGCT
Scleroderma hypogaeum A.....T.....AA..C.....T.....
Pisolithus arhizus    G.....TT.....T.....T.....A
Gyroporus cyanescens  G.A..G...A..A.G.T...A...A.....T.....CT.....A

Scleroderma laeve      AGTGTAATACTATGTAAGAGACCAAATAGGAAGAGAAATTTATTTACCTTTTATTTATTCATTATCTCTCTCATT
Scleroderma hypogaeum .....G.....T...
Pisolithus arhizus    ..A.T.....A.....T.....T...T...
Gyroporus cyanescens  ..A.....A...T..T.A.....C.....T.....T..A

Scleroderma laeve      TTAGTAGCTAATTTAGTAGGTAATGTACCATATTCATTTACTATAACAACTTCAGTAATAGTCTCTATTGGTTTATCA
Scleroderma hypogaeum .....G....C.....A.....G.....
Pisolithus arhizus    ....CT.....A.T.....T..A.....A.....
Gyroporus cyanescens  .....T.....T.....A.....A..T...T..A.....A.....

Scleroderma laeve      TTCACTATTCTTATTGGTGAACCTATATTAGGATTATATACATAAACTGCATTCTCTCTCATTCTTTATTCCTTCT
Scleroderma hypogaeum .....T.....T.....A...A
Pisolithus arhizus    ..T....CT.A.....T.....C.T.....A.T.....T.....A..G..
Gyroporus cyanescens  ..T....AT.A..A...T.....C.T.....GA.....A.T...T.....A...A

Scleroderma laeve      GGAACACCTTTAGCTTTAGTACCTTTATTAGTTTTAATGAATTAATAAGTTACTTAGCTAGAGCTTTCTCTTTAGGT
Scleroderma hypogaeum ..T.....A.....
Pisolithus arhizus    ..G.....T.....A.....
Gyroporus cyanescens  ..T..T..A.....T.....AC.....

Scleroderma laeve      ATAAGATTATTTGCTAATGTAGTAGCTGGACATACCTTATTAAAAATATTATCAACATTCTTATTAAAATGTTCTCT
Scleroderma hypogaeum ..C.....A.....A
Pisolithus arhizus    .....C..T.....A
Gyroporus cyanescens  .....A.....A.....A

                                ATPsint-R ←
Scleroderma laeve      GGTGGATTAATAATCTTTATATTAACATTATTACCATTGTCATTATTCTTAGCTATTACAGGATTAGAATTAGCTGTA
Scleroderma hypogaeum .....G.....
Pisolithus arhizus    .....A.....T..C...T...T.....
Gyroporus cyanescens  .....T...T...T.....T.....C.....A..T

Scleroderma laeve      TCATTTATTCAA
Scleroderma hypogaeum .....
Pisolithus arhizus    .....A...
Gyroporus cyanescens  .....A...

```

Figura 9. Alinhamento das sequências de nucleotídeos de *Scleroderma laeve* (acesso AF114457.1), *Scleroderma hypogaeum* (acesso AF114458.1), *Pisolithus arhizus* (acesso AF114456.1) e *Gyroporus cyanescens* (acesso AF114459.1) para o gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase encontradas no NCBI. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados e as direções das amplificações estão indicadas. As linhas pontilhadas indicam as bases conservadas entre as sequências (Clustal W)

4.3. Avaliação da expressão do gene que codifica a subunidade 6 de ATP sintase por RT-PCR

Foi observada a expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve* em todas as fases da associação ectomicorrízica com *E. grandis* e, também no fungo cultivado na ausência da planta (Figura 11A), confirmando a produção contínua da subunidade seis de ATP sintase. O resultado indica que esse gene é necessário não só para o desenvolvimento do fungo, mas também para a manutenção da associação ectomicorrízica. Os dados obtidos nesta pesquisa diferem dos resultados esperados, baseados em trabalhos prévios, que demonstraram que a expressão desse gene variou significativamente entre o micélio fúngico cultivado em vida livre e na associação ectomicorrízica (Coelho *et al.*, 2010; Duplessis *et al.*, 2005; Le Quère *et al.*, 2005). O gene que codifica para a subunidade ribossomal 17S de *S. laeve* mostrou homogeneidade entre as amostras de RNA total, uma vez que a expressão desse gene não variou durante os tempos analisados (Figura 11B).

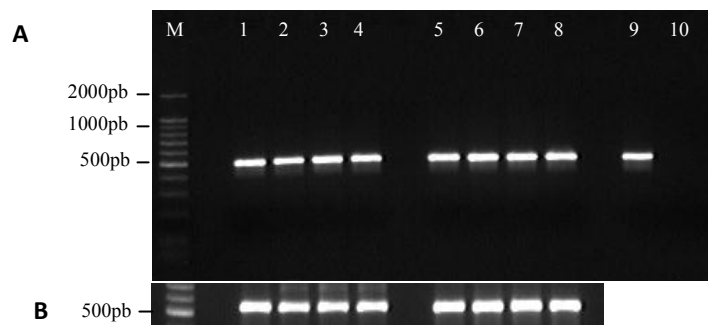


Figura 10. Análise do RT-PCR do gene que codifica subunidade seis de ATP sintase (A) e subunidade ribossomal 17S (B). Marcador de DNA 100 pb Ladder (M). Tecido ECM fase pré-simbiótica (1). Tecido ECM fase colonização (2). Tecido ECM fase diferenciação (3). Tecido ECM fase funcionamento (4). Micélio fúngico pré-simbiótico (5). Micélio fúngico três dias (6). Micélio fúngico 15 dias (7). Micélio fúngico 30 dias (8). DNA genômico de *Scleroderma laeve* (9). Controle negativo da reação (10).

A simbiose ectomicorrízica envolve complexos processos acompanhados por uma interação coordenada entre os simbioses. A fase pré-simbiótica, durante a qual acontece troca de sinais entre o fungo e a planta, tem um papel importante na formação da ectomicorriza. Essa troca de sinais é mediada por mudanças na expressão gênica em ambos os simbioses.

Certos genes que estão envolvidos na regulação do fluxo de íons como o gene que codifica ATPase em *Laccaria bicolor*, mostraram expressão diferencial durante as primeiras fases da associação ectomicorrízica com *Pinus resinosa*. Um amplo número de genes de sinalização é expresso nessas fases da associação uma vez que aparentemente mediam a troca de sinais entre os simbioses, possibilitando o desenvolvimento da ECM (Podila *et al.*, 2002).

Genes pré-simbióticos de fungos são envolvidos na formação da parede celular, metabolismo e processos de desintoxicação celular, sinalização celular, ciclo celular, padronização e transporte de proteínas através da parede celular, bem como a regulação da transcrição para o desenvolvimento (Podila *et al.*, 2002; Menotta *et al.*, 2004). Durante a fase pré-simbiótica, a ATP sintase mitocondrial pode fornecer o ATP necessário para sustentar as funções dependentes de energia durante a associação micorrízica (Ezawa *et al.*, 2002; Ferrol *et al.*, 2002 In: Valot *et al.*, 2005). A expressão de genes codificadores de ATP sintase durante o crescimento fúngico é importante para produzir o ATP necessário para o desenvolvimento de hifas (Besserer *et al.*, 2009).

Nas fases posteriores da formação ectomicorrízica, têm sido detectadas mudanças na regulação de genes envolvidos em funções existentes em ambos os parceiros, genes que promovem o crescimento celular, genes relacionados à biossíntese, diferenciação e sinalização, síntese da superfície celular e da matriz extracelular e metabolismo primário (Nehls *et al.*, 1998; Nehls *et al.*, 2001; Voiblet *et al.*, 2001; Balasubramanian *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2003; Tagu *et al.*, 2003; Sundaram *et al.*, 2004; Zaretsky *et al.*, 2006).

A expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve* durante as diferentes fases da associação com *E. grandis* coincide com a formação do manto e da Rede de Hartig. Foi observado para outras associações ectomicorrízicas expressão de genes relacionados com a cadeia respiratória e a ATP sintase durante o desenvolvimento destas estruturas (Le Quéré *et al.*, 2005). Durante a formação da Rede

de Hartig as células fúngicas proliferam entre as paredes celulares da raiz, e as membranas plasmáticas tornam-se altamente invaginadas. As células tornam-se multinucleadas e ricas em mitocôndrias e retículo endoplasmático, sugerindo uma alta atividade metabólica nessas células (Tagu *et al* 2002). 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 e Read, 1997). Le Quéré *et al.* (2005) sugeriram que a cadeia respiratória mitocondrial, em conjunto com a ATP sintase, é altamente regulada durante a formação das ECMs e especialmente durante a formação do manto e da Rede de Hartig. Esta regulação na respiração pode estar conectada a um metabolismo de carboidratos ativado por meio do ciclo do ácido cítrico (ciclo TCA). A ATP sintase também pode atender a demanda energética para a captação de solutos na interface planta-fungo (Portillo, 2000).

O sistema de micorrização *in vitro* utilizado neste trabalho pode ser adaptado para a identificação e estudo da expressão gênica em outras associações ectomicorrízicas. Este sistema facilita a análise da expressão gênica nos simbioses durante as diferentes fases da interação e é uma ferramenta útil para estudar os eventos moleculares associados ao desenvolvimento da simbiose ECM a um nível individual de componentes. A identificação de genes por meio de RT-PCR possibilitará o estudo de genes relacionados à micorrização, auxiliando ao entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na associação ectomicorrízica.

4.4. Análise filogenética do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em Basidiomicetos

Em *S. laeve*, *S. hypogaeum*, *P. arhizus* e *G. cyanescens*, as sequências dos genes que codificam a subunidade seis de ATP sintase (636 pb) correspondem a uma ORF com uma proteína de 212 aminoácidos.

A interpretação de sequências protéicas com a localização de domínios é uma prática comum na análise de dados de sequências. A identificação de um domínio conservado pode ser a única pista para identificar a função celular ou molecular de uma proteína, uma vez que indica similaridade parcial ou total com outras proteínas, algumas

das quais podem ter tido seu papel funcional caracterizado experimentalmente. Além disso, o estudo da arquitetura dos domínios de famílias protéicas muitas vezes revela sua história evolutiva.

Para a análise das sequências protéicas do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve*, *S. hypogaeum*, *P. arhizus* e *G. cyanescens*, foi utilizada a base de dados de Domínios Conservados do NCBI (CDD). Esta base de dados contém domínios conservados de uma série de bases de dados de fontes diferentes, cada uma destas pode ter seu próprio modelo de um domínio conservado determinado e assim é possível a identificação de domínios conservados em sequências protéicas e sítios funcionais da mesma por comparação. Os modelos que descrevem famílias com domínios conservados entre estas são agrupadas em superfamílias. Então, uma superfamília é um conjunto de modelos de domínio conservado, de uma ou mais bases de dados. Esses modelos representam domínios evolutivamente relacionados e podem ser redundantes entre si (Marchler-Bauer *et al.*, 2010).

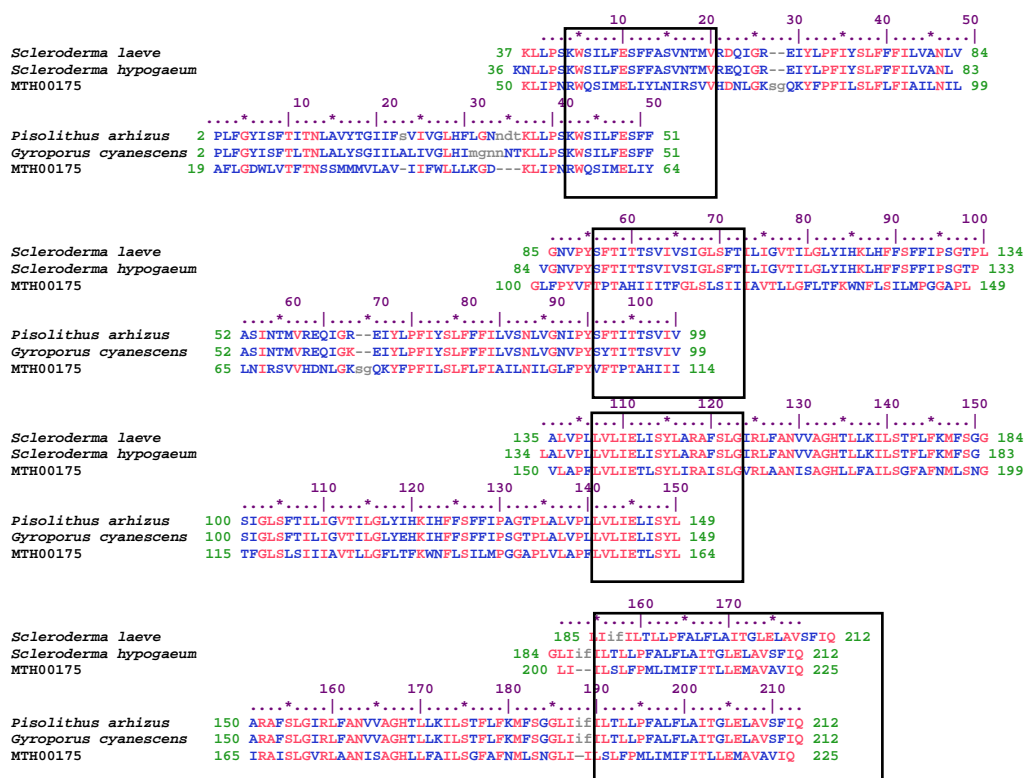


Figura 11. Alinhamento das seqüências protéicas da subunidade seis de ATP sintase. Foram usados para o alinhamento as seqüências de *Scleroderma laeve* (acesso AAD26683.1), *Scleroderma hypogaeum* (acesso AAD26684.1), *Pisolithus arhizus* (acesso AAD26682.1) e *Gyroporus cyanescens* (acesso AAD26685.1). São mostrados os domínios conservados entre estas (caixas em destaque). O alinhamento foi feito utilizando o banco de dados de domínios conservados do NCBI sendo identificadas essas seqüências como membros da superfamília MTH00175.

As sequências protéicas dos genes que codificam a subunidade seis de ATP sintase em *Scleroderma laeve*, *S. hypogaeum*, *Pisolithus arhizus* e *Gyroporus cyanescens* possuem domínios conservados com as sequências agrupadas na superfamília MTH00175 correspondente à proteína ATP sintase da CDD, fazendo com que essas sequências sejam identificadas como membros dessa superfamília (Figura 12). A análise comparativa das sequências protéicas permitiu a detecção de motivos conservados confirmando a relação entre estes basidiomicetos.

Para a análise filogenética das sequências da subunidade seis de ATP sintase, foi feito um alinhamento utilizando as sequências de basidiomicetos com menor valor e obtidas após o BLASTX (Tabela 1). De acordo com o esperado, as sequências da subunidade seis de ATP sintase alinharam razoavelmente bem mostrando um agrupamento por taxas (Figura 13).

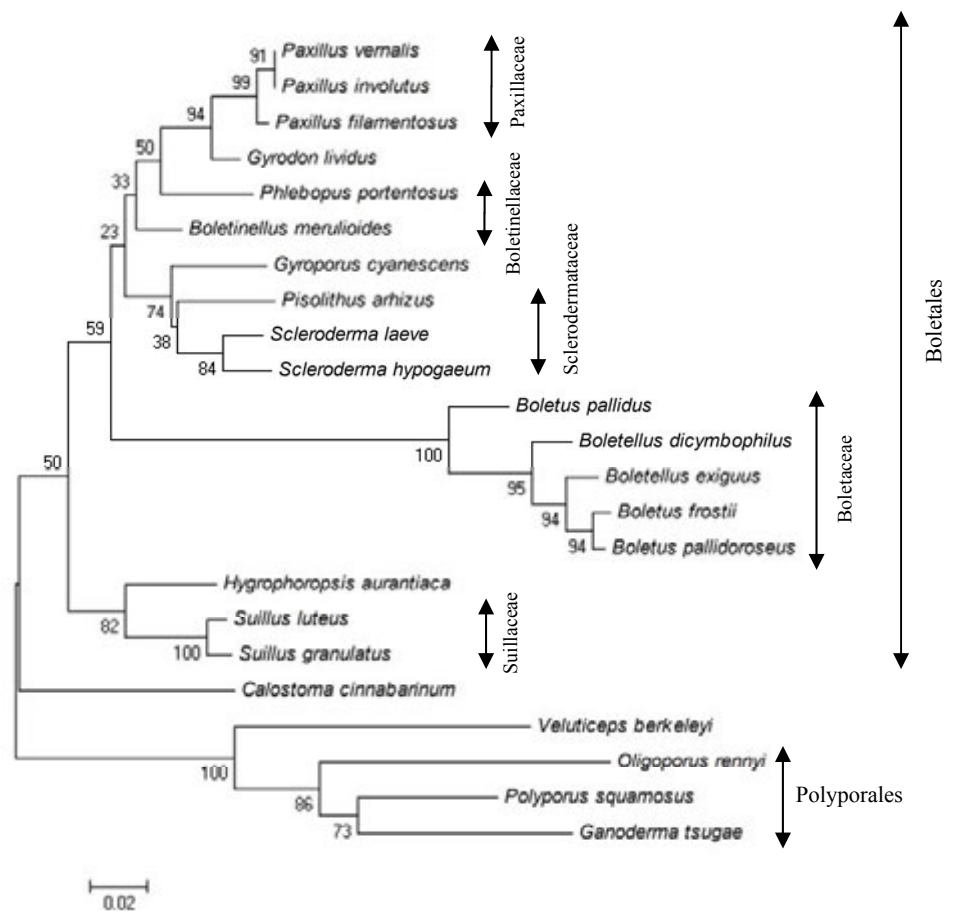


Figura 12. Análise filogenética das sequências proteica da subunidade seis da proteína ATP sintase em basidiomicetos. A árvore foi baseada na comparação de sequências de polipeptídeos do gene que codifica a subunidade seis da ATP sintase de *Scleroderma laeve*. A construção foi baseada no método *Neighbor-joining*. Os valores de *bootstrap* de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo. A distância dos ramos está indicada na parte inferior (MEGA 4.0.2).

Vários grupos monofiléticos foram resolvidos. Estes grupos estão correlacionados com a categoria taxonômica à qual cada espécie pertence. O agrupamento das espécies *P. vernalis*, *P. involutus* (91%) e *P. filamentosus* (99%) corresponde à família Paxillaceae. *Gyrodon lividus* também foi incluído nesse grupo (94%) como grupo não congênico, assim como relatado em pesquisas prévias (Kretzer & Bruns, 1999). As espécies *G. cyanescens*, *P. arhizus*, *S. laeve* e *S. hypogaeum* foram organizadas num grupo monofilético correspondente à família Sclerodermataceae (74%). *S. luteus* e *S. granulatus* foram agrupados na família Suillaceae (100%). As espécies *B. pallidus*, *B. dicymbophilus*, *B. exiguus*, *B. frostii* e *B. pallidodoroseus* formaram um grupo correspondente à família Boletaceae (100%). Todos esses grupos correspondem à ordem Boletales. As espécies *O. rennye*, *G. tsugae* e *P. squamosus* formaram um grupo monofilético correspondente à família Polyporales (86%). Alguns ramos, incluindo *H. aurantiaca* e *V. berkeleyi*, correspondem a "taxa" cujas posições não são bem explicadas.

As sequências codificadoras de proteínas de organela facilitam os alinhamentos, uma vez que possuem um alto número de cópias, evolução conservada e baixa frequência de mutações. Apesar de essas vantagens, genes de proteínas mitocondriais têm sido raramente utilizados em estudos com fungos. Isto é devido em parte à falta de oligonucleotídeos universais e à presença de grandes introns na maioria dos genes alvo. As sequências dos genes que codificam a subunidade seis de ATP sintase foram previamente utilizadas para estudar a relação filogenética entre organismos pertencentes à ordem Boletales (Kretzer e Bruns, 1999). A análise da relação filogenética entre as sequências proteicas da subunidade seis de ATP sintase realizada nessa pesquisa separou corretamente os grupos, confirmando a classificação taxonômica dessas espécies.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O fungo basidiomiceto *Scleroderma laeve*, utilizado neste trabalho, foi capaz de formar ectomicorrizas com *E. grandis*, demonstrado pelas mudanças morfológicas que ocorreram no sistema radicular durante o contato e estabelecimento da simbiose.

O sistema *in vitro* descrito neste trabalho permitiu a produção de ectomicorrizas entre *S. laeve* e *E. grandis*, sendo observado aumento no número de raízes laterais em todas as fases da associação, formação do manto fúngico e da Rede de Hartig. Neste sistema, a formação de ectomicorriza inicia-se ao 3º dia de contato, a diferenciação ao 15º e ao 30º dia há a formação completa e funcionamento da ectomicorriza.

A sequência parcial obtida do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase em *S. laeve* possui 503 pb e não foi detectada a presença de introns. A análise da expressão desse gene, nas diferentes fases da associação, mostrou que o mesmo é expresso em todas as fases da micorrização e no fungo mantido sem contato com o hospedeiro. Conclui-se que o sistema utilizado é adequado para os estudos da interação e da expressão gênica durante a associação ectomicorrízica em eucalipto. A expressão do gene que codifica a subunidade seis de ATP sintase, no fungo micorrízico *S. laeve*, nas diferentes fases da simbiose será analisada pela quantificação do transcrito por PCR em tempo real. Deste modo, será possível quantificar e observar se ocorre expressão diferencial desse gene durante a interação *S. laeve-E. grandis*.

A análise filogenética das sequências de aminoácidos da subunidade seis de ATP sintase de alguns basidiomicetos permitiu separar as espécies em grupos, confirmando a classificação taxonômica dos mesmos.

Utilizando este sistema de micorrização claramente definido, será possível observar as mudanças morfológicas, moleculares, fisiológicas e bioquímicas durante o desenvolvimento da ectomicorriza.

O sequenciamento de genomas de espécies de *Scleroderma* promoverá uma importante oportunidade para o entendimento dos processos pelo quais o fungo coloniza as raízes dos os seus hospedeiros e de interação com as plantas dentro dos ecossistemas logrando assim importantes funções vitais nos ciclos do nitrogênio e do carbono.

Nossos resultados oferecem conhecimento acerca de uma espécie fúngica capaz de formar ectomicorrizas com *Eucalyptus grandis*, indicando assim o potencial de *Scleroderma laeve* para promover o crescimento dessas plantas e a sua futura utilização em programas de inoculação em plantações de *Eucalyptus*.

A associação entre a biosíntese de proteínas e o desenvolvimento das ECM e a existência de polipeptídios relacionados à simbiose não está firmemente estabelecido. É necessário determinar o seu papel fisiológico durante a formação ectomicorrízica. Para alcançar esse conhecimento é preciso de futuros experimentos envolvendo o transcriptome da associação.

A identificação de genes por meio de varias outras ferramentas moleculares como a construção de bibliotecas subtrativas de *Scleroderma laeve* permitirá o estudo de diferentes genes envolvidos no desenvolvimento da ECM com *Eucalyptus grandis* levando ao entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos durante a associação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGANGAN, N.S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; DELACRUZ, R.E. (1996) Soil fumigation and phosphorus supply affect the formation of *Pisolithus-Eucalyptus urophylla* ectomycorrhizas in two acid Philippine soils. *Plant Soil*. 180: 259–266.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- BALASUBRAMANIAN, S.; KIM, S-J; PODILA, G.K. (2002) Differential expression of a malate synthase gene during the preinfection stage of symbiosis in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*. 154: 517–527.
- BASEIA, I.G; MILANEZ, A.I. (2000). First record of *Scleroderma polyrhizum* Pers. (Gasteromycetes) from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 14: 181-184.
- BESSERER, A.; BÉCARD, G.; ROUX, C.; SÉJALON-DELMAS, N. (2009) Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signaling & Behavior*. 4:1, 75-77.
- BOLTON, H.Jr.; FREDRICKSON, J.K; ELLIOT, L.F. (1992) Microbial ecology of the rhizosphere. In: Metting FB Jr (ed) *Soil microbial ecology: applications in agriculture and environmental management*. Dekker, New York, pp 27–65.
- BONFANTE, P.; ANCA, I. (2009) Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology*. 63:363–83.
- BRUN, A.; CHALOT, M.; FINLAY, R.D.; SÖDERSTRÖM, B. (1995) Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth: I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytologist*. 129, 487 e 493.

- BURGUESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; BERNARD, D. (1996) Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist*. New York, v. 127, p. 731-739.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. (1994) Variation in mycorrhizal development and growth stimulation of 20 *Pisolithus* isolates inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist*. 127 : 731–739
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. (1993) The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. *Plant Soil*. 153: 155–164.
- BURGUESS, T.; MALAJCZUK, N. (1990) The effect of ectomycorrhizal fungi on reducing the variation of seedling growth of *Eucalyptus globulus*. *Agriculture, Ecosystem & Environment*. 28:41-46.
- CAMPOS, D.T.S (2004) *Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto*. 82p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- CHAN, S.; PURYEAR, J.; CARNIER, J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11: 113-116.
- CHEN, Y.I.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. (2006) Effect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. *New Forests*. 31:453–467.
- CHEN, Y.L.; GONG, M.Q.; XU, D.P.; ZHONG, C.L.; WANG, F.Z.; CHEN, Y. (2000) Screening and inoculant efficacy of Australian ectomycorrhizal fungi on *Eucalyptus urophylla* in the field. *Forest Research*. 13: 569–576.
- COELHO, I.; QUEIROZ, M.V.; COSTA, M.D.; KASUYA, M.C.; ARAÚJO, E.F. (2010) Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*. 20: 531-540.
- CORTEZ, V. G.; BASEIA I. G.; SILVEIRA, R. M. B. (2011) Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 24: 44 -52.
- COSTA, M.D.; CAMPOS, A.N.; SANTOS, M.L.; BORGES, A.C. (2010) In vitro ectomycorrhiza formation by monokaryotic and dikaryotic isolates of *Pisolithus microcarpus* in *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*. 34: 377-387.
- COURTY, P.E.; POLETTO, M.; DUCHAUSSOY, F.; BUÉE, M.; GARBAYE, J.; MARTIN, F. (2008) Gene Transcription in *Lactarius quietus-Quercus petraea* Ectomycorrhizas from a Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 6598–6605.

- DANIELSON, R.M. (1984) Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in north-eastern Alberta. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.62, n.5, p.932-939.
- DELL, B.; MALAJCZUK, N.; BOUGHER, N.L.; THOMSON, G. (1994) Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vitro with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza*. 5: 129-138.
- DEXHEIMER, J.; GERARD, J.; GENET, P. (1994) Study of transformations of the root system of *Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*. I. Aptitude for mycorrhization of different kinds of roots. *Phytomorphology*. 44 :235–245
- DITENGOU, F.A.; BÉGUIRISTAIN, T.; LAPEYRIE, F. (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by IAA. *Planta*. 211: 722-728.
- DITENGOU, F.A.; LAPEYRIE, F. (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 13: 151–158.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.E.; TAGU, D.; MARTIN, F. (2005) Transcript patterns associated with Ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 165: 599-611.
- ECKERT, S.E.; KUBLER, E.; HOFFMANN, B.; BRAUS, G.H. (2000) The tryptophan synthase-encoding *trpB* gene of *Aspergillus nidulans* is regulated by the cross-pathway control system. *Molecular and General Genetics*. 263: 867–876.
- EZAWA, T.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*. 244: 221–230.
- FERROL, N.; BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C. (2002) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 244: 231–237.
- GAY, G.; NORMAND, L.; MARMEISSE, R.; SOTTA, B.; DEBAUD, J.C.; (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist*. 128: 645–657.
- GEA, L.; NORMAND, L.; VIAN, B.; GAY, G. (1994) Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. *New Phytologist*. 128: 659–670.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L. (1996) Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* Plantations in Santa Catarina (Southern Brazil) In: International Conference on Mycorrhizas 1, Berkeley. Abstract...University of California. p.52

- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Southern Brazil. *Mycologia*. 92: 1166-1177.
- GIACHINI, A.J.; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. (2004) Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunii* and *Pinus taeda* in Southern Brazil. *Mycorrhiza*. 14: 375-381.
- GOGALA, N. (1991) Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experimentia*. 47: 331-339.
- GURGEL, F.E.; SILVA, B.D.B.; BASEIA, I.G. (2008) New records of *Scleroderma* from Northeastern Brazil. *Mycotaxon*. 105: 399-405.
- GUS-GITFORESTRY (2009) XIII World Forestry Congress For Painel Florestal. Buenos Aires, 18-25 October 2009. Interview related to the global *Eucalyptus* map 2009. Courtesy of painel Florestal TV.
- GUSMAILINA, P.G.; KOMARAYATI, S.; ROSTIWATI, T. (2001) Alternative on the utilization of activated bamboo and candle nut charcoal as a plant's soil conditioning. *Buletin Penelitian Hasil Hutan*. 19: 185-199.
- GUZMÁN, G. (1970). Monografía del género *Scleroderma*. *Darwiniana*, 16: 233-407.
- HAUSE, B.; FESTER, T. (2004) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. Department of Secondary Metabolism. Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Germany. *Planta*. 184-196.
- HIGA, R.C.V.; MORA, A.L.; HIGA, A.R. (2000) Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. Colombo: Embrapa Florestas. 31p. (Embrapa Florestas. Documentos, 54).
- <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>
- <http://www.macrogen.com>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>
- HORTON, T. R.; BRUNS, T. D. (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Revista Molecular Ecology*. p. 1855-1871.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.

- KAWANO, T.; KAWANO, N.; LAPEYRIE, F. (2001) Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid dependent superoxide generation by shorseradich peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288: 546-551.
- KRETZER, A.M.; BRUNS, T.D. (1999) Use of *atp6* in fungal phylogenetics: An example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13: 483–492.
- LAGRANGE, H.; JAY-ALLEMAND, C.; LAPEYRIE, F. (2001) Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*. 150: 349–355.
- LAST, F.T.; MASON, P.A.; INGLEBY, K.; FLEMING, L.V. (1984) Sucession of fruitbodies of sheathing mycorrhizal fungi associated with *Betula pendula*. *Forest Ecology Management, Amsterdam*, v.9, n.1, p.229-234.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D.P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *MPMI. The American Phytopathological Society*. 18: 659–673.
- LOEWE, A.; EINIG, W.; SHI, L.; DIZENGREMEL, P.; HAMPP, R. (2000). Mycorrhization and elevated CO₂ both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. *New Phytologist*. 145: 565-574.
- LU, X.H.; MALAJCZUK, N.; BRUNDRETT, M.; DELL, B. (1999) Fruiting of putative ectomycorrhizal fungi under blue gum (*Eucalyptus globulus*) plantations of different ages in Western Australia. *Mycorrhiza*. 8: 255–261.
- LU, X.H.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. (1998) Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 8: 81–86.
- MALAJCZUK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in vitro. *New Phytologist*. 114:627–631
- MANKEL, A.; KRAUSE, K.; KOTHE, E. (2002) Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1408–1413.
- MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M.K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R.C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C.J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; OMELCHENKO, M. V.; ROBERTSON, C.L.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; ZHANG, D.;

- ZHANG, N.; ZHENG, C.; BRYANT, S.H. (2010) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*. 1-5.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRÉN, D.; BRUN, A.; DANCHIN, E.G.J.; DUCHAUSSOY, F.; *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 452: 88-93.
- MARTIN, F.M.; TAGU, D. (1995) Ectomycorrhiza development: a molecular prospective. *In: Varma AK, Hock B (eds) Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 29–59
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H. VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signal and communication genes. *New Phytologist*. 151:145-154.
- MARTIN, F.; KOHLER, A.; DUPLESSIS, S. (2007) Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:204–210.
- MARTIN, F.; LAURENT, P.; CARVALHO, D.; BURGESS, T.; MURPHY, P.; NEHLS, U.; TAGU, D. (1995) Fungal gene expression during ectomycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*. 73: S541–S547.
- MASSICOTE, H. B.; PETERSON, R.L.; ASHFORD, A.E. (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Botany*. 65: 1927-1939.
- MASON, P.A.; INGLEBY, K.; MUNRO, R.C.; WILSON, J.; IBRAHIM, K. (2000) The effect of reduced phosphorus concentration on mycorrhizal development and growth of *Eucalyptus globules* Labill. seedlings inoculated with 10 different fungi. *Forest Ecology Management*. 128: 249–258.
- MASON, P. A.; LAST, F. T.; PELHAM, J.; INGLEBY, K. (1982) Ecology of some fungi associated with a ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). *Forest Ecology Management*, Amsterdam, 4:19-39.
- MEIJER, A.A.R. (2006) Macromycete survey from Brazilian State of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal*. Curitiba 68: 1-59.
- MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J.; SOUZA, E. L.; OLIVEIRA, V. L. (2006) Arbuscular and ectomycorrhizal fungi in eucalypt cultivation and grassland sandy soil. *Ciência Florestal*. 16: 293-301.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. (2004) Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vitad. and *Tilia Americana* L. *Current Genetics*. 46: 158-165.

- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; MAGEL, E.; HAMPP, R. (2001a) Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist*. 150: 533–541.
- NEHLS, U.; BOCK, A.; ECKE, M.; HAMPP, R. (2001b) Differential expression of the hexose-regulated fungal genes AmPAL and AmMst1 within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. *New Phytologist*. 150:583-589.
- NEHLS, U.; WIESE, J.; GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 11: 167–176.
- PEREIRA, O.L.; COSTA, M.D.; BORGES, A.C.; ARAÚJO, E.F.E.; KASUYA, M.C.M. (2005) Compatibility and ectomycorrhiza formation among *pisolithus* isolates and *eucalyptus* spp. *Revista brasileira de Ciência do Solo*. 29: 337-344.
- PETER, M.; COURTY, P-E.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; MARTIN, F. (2003) Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 159: 117–129.
- PIOLA, F.; ROHR, R.; ADERKAS, P. VON. (1995) Controlled mycorrhizal initiation as a means to improve root development in somatic embryo plantlets of hybrid larch (*Larix x eurolepis*). *Physiologia Plantarum*. 95 : 575–580
- PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J.H.; HYMES, M.J. (2002) Fungal gene expression in early symbiotic interaction between *Laccaria bicolor* and red pine. *Plant and Soil*. 244: 117-128.
- PORTILLO, F. (2000) Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1469: 31-42.
- PROMEGA CORPORATION. (2010) Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System Instructions for use of products a1270, a1330, a1340, a1460 and a1470. Technical bulletin. part# tb225. USA.
- PROMEGA CORPORATION. (2005) RQ1 RNase-Free DNase. 2800 Woods Hollow Road·Madison, WI 53711-5399. USA.
- QIAGEN. (2006) DNeasy® Plant Handbook. Julho 2006. USA.
- REBOUTIER, D.; BIANCHI, M.; BRAULT, M.; ROUX, C.; DAUPHIN, A.; RONA, J.P.; LEGUE, V.; LAPEYRIE, F.; BOUTEAU, F. (2002) Indolic compound hypaphorine produced by ectomycorrhizal fungi interferes with auxin action and evokes early responses in nonhost *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 15: 932-938.

- REDDELL, P.; MILNES, A.R. (1992) Mycorrhizas and other specialized nutrient-acquisition strategies-their occurrence in woodland plants from Kakadu and their role in rehabilitation of waste rock dumps at a local uranium-mine. *Australian Journal of Botany*. 40:223-242.
- RICK, J. (1961) *Basidiomycetes Eubasidii* in Rio Grande do Sul - Brasilia. 6. *Iheringia, Série Botânica*, 9: 451-479.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. (eds). *Bioinformatics Methods and protocols: methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-368.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANON, K.B., BÂ, A.M., DELARUELLE, C., DUPONNOIS, R.; MARTIN, F. (2009) Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinoid legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. *Mycorrhiza*. 19:571–584.
- SMITH, S.A.; READ, D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.
- SOBESTIANSKY, G. (2005) Contribution to a macromycete survey of the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48: 437-457.
- SOUZA, B.L.; PINTO, B.P.; SILVA, F.; OLIVEIRA, V.L. (2008) New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília*. 43: 235-241.
- SOUZA, V.C.; SILVA, R.A.; CARDOSO, G.D.; BARRETO, A. F. (2006) Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 10: 612–618.
- SPEACHT, C.A.; DIRUSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C.A. (1982) A method for extracting high molecular weight desoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*. 119:158–163.
- SUNDARAM, S., BRAND, J.H.; HYMES, M.J.; HIREMATH, S.; PODILA, G.K. (2004) Isolation and analysis of a symbiosis-regulated and Ras-interacting vesicular assembly protein gene from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*. 161: 529–538.
- SUNDARAM, S.; KIM, S.J.; SUZUKI, H.; MCQUATTIE, C.J.; HIREMATH, S.T. PODILA, G.K. (2001) Isolation and characterization of a symbiosis regulated RAS from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*. 14, 618–628.

- TAGU, D.; PALIN, B.; BALESTRINI, R.; GELHAYE, E.; LAPEYRIE, F.; JACQUOT, J.-P.; SAUTIÈRE, P.-E.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. (2003) Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-*S*-transferase from *Eucalyptus globulus* roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 611–618.
- TAGU, D.; MARMEISSE, R.; BAILLET, Y.; RIVIÈRE, S.; PALIN, B.; BERNARDINI, F.; MÉREAU, A.; GAY, G.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. (2002) Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus HydPt-1* gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Histochemistry* 46: 23-29.
- TAMURA, K.; DUBLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 11; 22: 4673-4680.
- VALOT, B.; DIEU, M.; RECORBET, G.; RAES, M.; GIANINAZZI, S. E.; DUMAS-GAUDOT, E. (2005) Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Molecular Biology*. 59:565–580
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal*. 25, 181–192.
- WONG, K.K.Y.; FORTIN, J.A. (1989) A petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*. 67: 1713–1716
- ZARETSKY, M.; SITRIT, Y.; MILLS, D.; ROTH-BEJERANO, N.; KAGAN-ZUR, V. (2006) Differential expression of fungal genes at preinfection and mycorrhiza establishment between *Terfezia boudieri* isolates and *Cistus incanus* hairy root clones. *New Phytologist*. 171 : 837–846.