

LUCIANO DE SOUZA VESPOLI

**PRESENÇA E CARACTERÍSTICAS DE RNAs MENSAGEIROS NOS
BASIDIÓSPOROS DE *Pisolithus microcarpus***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

LUCIANO DE SOUZA VESPOLI

**PRESENÇA E CARACTERÍSTICAS DE RNAs MENSAGEIROS NOS
BASIDIÓSPOROS DE *Pisolithus microcarpus***

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

APROVADA: 18 de agosto de 2010.

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof. André Narvaes da Rocha Campos

Prof^ª. Célia Alencar de Moraes

Prof^ª. Elza Fernandes de Araújo
(Coorientadora)

Prof^ª. Marisa Vieira de Queiroz
(Presidente da Banca)

A Deus.

Aos meus pais.

À minha família e amigos.

Aos amigos do CSF.

Aos amigos do G7.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, meu orientador, pela preocupação, pelos conselhos e pelos seus ensinamentos durante esse período.

À Professora Marisa Vieira de Queiroz, pelas várias sugestões, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

À Professora Elza Fernandes de Araújo, pelo apoio e pela preocupação.

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges, pela oportunidade ainda na graduação, pelos ensinamentos e pela atenção.

À Professora Denise Mara Soares Bazzolli, pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar.

À Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pelo apoio, pela preocupação e pelo incentivo.

Ao Professor André Narvaes da Rocha Campos, pelo apoio, pelos conselhos e pelas sugestões.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Associações Micorrízicas, Vitim, Matheuzim, Gilbert, Marliane, Muriel, Laélia, Bruno, Lydice, Lôra, Andrezão, André, Carla, Ozias, Adalberto, Zé Maria e suas meninas, pelo ótimo convívio e pelo ambiente de trabalho.

À Cíntia, pela eficiência no trabalho prestado no laboratório, onde hoje é indispensável, e, também, pela grande amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética de Micro-organismos, Carol, Mari, Mariana, Jaquie, Maíra, Ti, Jana, Blanca, Gui, Fábio, Mateus, pela disponibilidade em ajudar, pelo acolhimento e pelo ótimo convívio.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios, especialmente, Goiano, Tati, Val, Alê, Ana, Paulo, Nique, pela disponibilidade em ajudar, pela atenção, pela amizade e pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Seu Paulo, Seu Toninho, Danilo, Evandro, Rita, Nilcéa, Laura, Pablo e Zé Carlos, pela ajuda e pela atenção sempre.

Ao amigo Dr. Alexandre Cordeiro, pela disponibilidade em me ajudar e pela atenção.

Aos amigos do CSF, Vitim, Goiano, Matheuzim e Gilbert, minha família em Viçosa, pelo apoio incondicional, pela grande amizade, pelos conselhos, pelos vários momentos de desabafo e de alegria em todas as nossas “Quintas da Micro”.

Aos amigos do G7, Gut, Pedrim, Gugu, Zé, PH, Filardi, pela grande amizade, pelos momentos de alegria, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos meus grandes amigos, Lipe, Fernando, Portuga e Cacá pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio.

Aos meus amigos de república, Cacá, Hudim, John, Chico e Montanha, pela amizade, pelo companheirismo e pelos conselhos.

Ao meu amigo Hugo, pela amizade, pelo acolhimento e pela atenção.

À Ana Lúcia, minha querida Mãe, pelo exemplo, pelo amor eterno, pelo apoio, pelo incentivo, pela preocupação e por ter sempre acreditado em mim.

Ao “Sois” Expedito, meu querido Pai, pelo exemplo e pela força que me dá para caminhar, mesmo não estando presente.

Ao Tio Junim, pelo exemplo, pelo seu amor incondicional, pela preocupação em todos os momentos e pelos conselhos.

Aos meus irmãos, César, Denísia, Marta, Sérgio, Silvana e Basílio, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos, pela amizade e pela preocupação.

Aos meus tios, especialmente, Marta, Fiinha, Cidinha, Marcim, Hilda e Zé Antônio, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos meus primos, especialmente, Deir, Priscila, Gabriela, Tati e Paulinha, pela amizade e pela preocupação.

À Geraldinha, pela ajuda e pelo companheirismo.

BIOGRAFIA

Luciano de Souza Vespoli, filho de Expedito Vespoli (*in memoriam*) e de Ana Lúcia de Souza Vespoli, nasceu no dia 02 de maio de 1986 na cidade de Barbacena, MG. Iniciou a graduação em Biotecnologia na Universidade Presidente Antônio Carlos em fevereiro de 2004, tendo se graduado em janeiro de 2008. Em agosto de 2008 iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

CONTEÚDO	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Caracterização do mRNA de basidiósporos e do micélio dicariótico de <i>P. microcarpus</i>	11
2.1.1. Coleta de basidiósporos e isolamento de dicários.....	11
2.1.2. Extração de RNA total, purificação de mRNA e síntese de cDNA de <i>P. microcarpus</i>	12
2.1.3. Avaliação da presença de transcritos.....	13
2.1.4. Análise da quantidade de transcritos.....	13
2.1.5. Síntese de cDNA, clonagem e construção da biblioteca de cDNA total de basidiósporos.....	16
2.1.6. Sequenciamento e anotações das sequências	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18

vii

3.1. Presença de transcritos envolvidos no metabolismo de lipídeos, glicogênio, trealose, nitrogênio, via glicolítica e via das pentoses fosfato no micélio e nos basidiósporos de <i>P. microcarpus</i>	18
3.2. Análise por qPCR dos transcritos dos genes <i>d15fa</i> , <i>ntrh</i> e <i>ag13</i>	23
3.3. Análise da biblioteca de cDNA construída a partir de cDNA de basidiósporos de <i>P. microcarpus</i>	25
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

VESPOLI, Luciano de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010.
Presença e características de RNAs mensageiros nos basidiósporos de *Pisolithus microcarpus*. Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Elza Fernandes de Araújo

As baixas percentagens de germinação dos basidiósporos do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* dificultam a obtenção de estirpes monocarióticas, material para estudos de genética quantitativa da associação micorrízica, inviabilizam a utilização de esporos em experimentos de mutagênese visando à identificação de genes importantes para a simbiose, além de dificultar a utilização desses propágulos como inoculantes em viveiros florestais. A caracterização do mRNA presente no interior desses basidiósporos poderá fornecer informações sobre o nível de preparação que têm para iniciar o processo de germinação e sustentar o crescimento inicial das hifas. O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar os mRNA presentes nos basidiósporos do fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* após a basidiosporogênese. O RNA total foi extraído de basidiósporos maduros e micélio, procedendo posteriormente a obtenção mRNA para a síntese de cDNA. Determinou-se a presença de transcritos de 14 genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, na mobilização de glicogênio, na mobilização de trealose, na assimilação de nitrogênio, na via glicolítica, na via das pentoses fosfato e na degradação de glicanas. A análise por qPCR foi realizada visando comparar a quantidade de transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13* que codificam respectivamente as enzimas ácido graxo- Δ^{15} desaturase, α -trealase neutra e 1,3- α -glicosidase, nos basidiósporos e no micélio dicariótico. Os 14

transcritos avaliados foram encontrados tanto no micélio dicariótico quanto nos basidiósporos, sugerindo a preparação desses propágulos para iniciar e sustentar o processo de germinação. A análise por qPCR indicou maior quantidade de transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13* no interior dos basidiósporos quando comparado ao micélio dicariótico. Esse resultado sugere a participação de enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos insaturados, mobilização de trealose e degradação de glicanas durante o processo de germinação. Uma biblioteca de cDNA foi construída a partir dos fragmentos de cDNA dos basidiósporos, sendo caracterizada por meio do sequenciamento de 288 clones. Foram obtidas 119 sequências que, ao serem agrupadas, resultaram em 12 *ESTs* (*expressed sequence tags*). A sequência de aminoácidos deduzida da *EST* referente ao clone 277 apresentou similaridade significativa com proteína envolvida no metabolismo respiratório, podendo ser importante durante o processo de germinação. Outras *ESTs* apresentaram identidade significativa com *ESTs* depositadas no banco de dados do NCBI ainda não identificadas. Alternativamente, sugere-se que essas *ESTs* possam ser codificadoras de proteínas específicas dos basidiósporos de *P. microcarpus*, importantes para a etapa de germinação desses propágulos.

ABSTRACT

VESPOLI, Luciano de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2010.
Presence and characteristics of messenger RNA in the basidiospores of *Pisolithus microcarpus*. Advisor: Maurício Dutra Costa. Co-Advisors: Marisa Vieira de Queiroz and Elza Fernandes de Araújo

The low germination percentages of *P. microcarpus* basidiospores represents a major drawback for obtaining monokaryotic strains for quantitative genetic studies on the mycorrhizal associations, the use of spores in mutagenesis experiments aiming at the identification of genes important to the symbiosis, and the use of these propagules as inoculants in forest nurseries. The characterization of the mRNA present within the fungal basidiospores may provide information on the level of preparedness of the spores to germinate and sustain initial hyphal growth. The aim of this work was to characterize the mRNA present in the basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *P. microcarpus* after basidiosporogenesis. Total RNA was extracted from the mature basidiospores and mycelium and mRNA was used for cDNA synthesis. An analysis of the presence of 14 gene transcripts involved in lipid metabolism, glycogen mobilization, trehalose mobilization, nitrogen assimilation, glycolysis, pentose phosphate pathway and glucan degradation using cDNA from the fungal basidiospores and dikaryotic mycelium was done. qPCR analysis was performed to compare the amount of transcripts of the genes *d15fa*, *ntrh*, and *ag13* which code respectively, for Δ^{15} fatty acid desaturase, neutral α -trehalase, and α -1,3-glucosidase in the dikaryotic mycelium and basidiospores. The 14 transcripts studied were present both in the dikaryotic

mycelium and in the basidiospores, indicating a preparedness of these propagules to initiate and sustain germination. qPCR analysis indicated a higher amount of transcripts of genes the *d15fa*, *ntrh*, and *ag13* inside the basidiospores when compared to the dikaryotic mycelium. These results suggest a higher need for enzymes involved in the synthesis of unsaturated fatty acids, trehalose mobilization, and glucan degradation during basidiospore germination. A cDNA library was constructed from basidiospore mRNAs and 288 clones were sequenced. One hundred and nineteen sequences were obtained, resulting in a total of 12 *ESTs* (expressed sequence tags). The amino acid sequence deduced from the *EST* corresponding to clone 277 showed significant similarity to a protein involved in respiratory metabolism and may be important during the germination process. Other *ESTs* showed significant identity to unknown *ESTs* deposited in the NCBI database. These *ESTs* may code for proteins that are specific of the basidiospores of *P. microcarpus*. However, to confirm this hypothesis, other clones must be sequenced to better characterize the cDNA library.

INTRODUÇÃO GERAL

A literatura relata as baixas percentagens de germinação dos basidiósporos do fungo ectomicorrízico *Pisolithus* spp., as quais variam de 0,001 a 0,38%. Essa característica dificulta a obtenção de estirpes monocarióticas, oriundas da germinação de basidiósporos, que constituem o material biológico básico para os estudos de genética quantitativa da associação micorrízica. Além disso, esse fato impede a utilização de basidiósporos em experimentos de mutagênese, dificultando a identificação de genes de importância à simbiose, e desestimula o desenvolvimento e a adoção de inoculantes ectomicorrízicos à base de basidiósporos devido à eficiência relativamente baixa dessas formulações.

Alguns fatores químicos estimulam a germinação dos basidiósporos de *Pisolithus microcarpus*, a exemplo dos ácidos láctico, fumárico, acético, succínico e cítrico, e de compostos flavonóides, como a quercetina, liberados pelas raízes de plantas hospedeiras e não-hospedeiras. A ampla variação entre as espécies hospedeiras quanto à capacidade de promover a germinação dos esporos sugere que diferenças quantitativas e qualitativas significativas na composição dos exsudatos radiculares possam contribuir de maneira decisiva na indução do processo.

Também, as características estruturais dos basidiósporos e os tipos de compostos orgânicos armazenados podem favorecer ou não a germinação. Os basidiósporos de *P. microcarpus* apresentam parede rígida, hidrofóbica e impermeável, fato que dificulta a entrada de compostos químicos estimulatórios e a saída do tubo germinativo. Os basidiósporos armazenam lipídeos, glicogênio,

proteínas e RNA, indicando provisão para a germinação e o crescimento inicial das hifas. Os ácidos graxos constituem a principal reserva de carbono e energia dos basidiósporos, sendo possivelmente mobilizados nos estágios iniciais de desenvolvimento do fungo.

Durante a germinação, prévia ou concomitantemente à produção do tubo germinativo e das novas hifas, mudanças significativas na parede celular e no catabolismo das reservas de carbono devem ocorrer visando à produção do novo micélio. Sugere-se que a presença de RNA nos basidiósporos possa facilitar o processo de mobilização das reservas de carbono, permitindo a ativação do metabolismo dos basidiósporos em uma fase de atividade transcricional e de biossíntese limitadas.

Até o momento, a literatura não dispõe de informações sobre as moléculas de mRNA presentes nos basidiósporos de *P. microcarpus*. Tal conhecimento poderá fornecer informações importantes sobre os genes envolvidos no metabolismo das reservas de carbono e na degradação de componentes presentes na parede do basidiósporo, contribuindo para o esclarecimento dos processos envolvidos na germinação, do estado fisiológico em que os basidiósporos se encontram e do nível de preparação para iniciar e sustentar a germinação e o crescimento inicial das hifas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de caracterizar os mRNA presentes nos basidiósporos maduros do fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* ao final da basidiosporogênese.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As ectomicorrizas são associações simbióticas mutualistas entre as raízes de plantas e fungos do solo, sendo caracterizadas pela presença de uma camada de hifas que recobre a superfície das raízes laterais finas, constituindo o manto, e o crescimento micelial nos espaços intercelulares do córtex radicular e, ou da epiderme. Os fungos ectomicorrízicos contribuem de forma significativa para a sobrevivência de amplo grupo de espécies vegetais, podendo auxiliar na redução dos custos de produção de biomassa e dos impactos sobre o meio ambiente resultantes da aplicação de técnicas modernas de produção (Souza *et al.*, 2006). Em geral, o fungo absorve nutrientes inorgânicos do solo e os transporta para as raízes por meio do micélio vegetativo, contribuindo para o melhor crescimento vegetal (Smith & Read, 2008).

O fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp., pertencente à classe dos *Basidiomycetes*, família *Sclerodermataceae*, está amplamente distribuído em todos os continentes (Aggangan *et al.*, 2010; Azul *et al.*, 2010; Peay *et al.*, 2010) e interage simbioticamente com grande variedade de plantas hospedeiras (Cairney & Chambers, 1997), principalmente as pertencentes aos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. O interesse nesse fungo no Brasil deve-se, em particular, ao potencial de aplicação em viveiros de eucalipto, essência florestal que ocupa extensas áreas no país, com cerca de 4,2 milhões de hectares plantados. O eucalipto tem sido usado para a produção de celulose e papel, madeira em tora e para a produção florestal não madeireira, gerando empregos diretos e indiretos, contribuindo significativamente para a economia do país.

O Estado de Minas Gerais detém 29% da área plantada com essa essência florestal (ABRAF, 2009).

O fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* produz milhões a trilhões de basidiósporos uninucleados em corpos de frutificação especializados, denominados basidiocarpos (Chambers & Cairns, 1999; Campos & Costa, 2010a). Esses basidiósporos são facilmente dispersos com auxílio do vento, da água de chuva e de animais. Quando depositados no solo, entram em contato com as raízes da planta hospedeira, sendo estimulados a germinar.

A germinação é a primeira etapa na formação de ectomicorrizas quando os basidiósporos são a única fonte de inóculo. Esse evento tem sido amplamente estudado em várias espécies fúngicas, visando ao desenvolvimento de estratégias de baixo custo para a introdução de fungos ectomicorrízicos em viveiros florestais (Fries, 1987; Ohta, 1988; Kope & Fortin, 1990; Carvalho *et al.*, 1997; Costa, 2002). Contudo, devido às baixas percentagens de germinação, a prática de inoculação não é utilizada com frequência. Para *Pisolithus* spp., a percentagem de germinação varia de 0,001 a 0,38% (Lamb & Richards, 1974; Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002; Pereira, 2004).

Vários fatores induzem a germinação dos basidiósporos de *Pisolithus* (Costa, 2002; Pereira, 2004), como alguns ácidos orgânicos de cadeia curta, compostos flavonóides e a presença de raízes de plantas hospedeiras e não-hospedeiras (Pereira, 2004). Em experimentos de germinação de basidiósporos *in vitro*, foi constatado que os compostos que propiciaram maior estímulo à germinação foram os ácidos láctico, fumárico, acético, succínico e cítrico, enquanto que o flavonóide mais eficiente foi a quercetina (Pereira, 2004). Alguns flavonóides, como a luteolina, a quercetina, a hesperidina e a morina foram testados como estimuladores da germinação de basidiósporos do fungo ectomicorrízico *Suillus bovinus*, apresentando efeito positivo na indução do processo (Kikuchi *et al.*, 2007).

O crescimento de determinados fungos micorrízicos é estimulado por exsudatos radiculares (Bécard *et al.*, 2004; Gomez-Roldan *et al.*, 2007; Akiyama *et al.*, 2008), caracterizados pela presença de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e lipídeos (Fries *et al.*, 1985). Além disso, a presença desses compostos em diferentes concentrações determinará o estabelecimento e o desenvolvimento da associação simbiótica. Na rizosfera, esses compostos atuam como moléculas-sinais, influenciando a atividade e o crescimento dos micro-organismos característicos desse ambiente (Fries *et al.*, 1985). A exemplo de alguns exsudatos radiculares que estimulam a

mitose e o metabolismo energético de fungos micorrízicos arbusculares, favorecendo o crescimento desses micro-organismos (Besserer *et al.*, 2006; Besserer *et al.*, 2008).

Pouco se sabe sobre os eventos iniciais de estímulo à germinação de basidiósporos para o subsequente estabelecimento da associação entre *Pisolithus* e *Eucalyptus*. A baixa percentagem de germinação relatada para *Pisolithus* sp. (Bulmer & Beneke, 1964; Lamb & Richards, 1974; Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002) motivou a realização de alguns estudos na tentativa de elucidar essa dificuldade e alguns fatos foram hipotetizados como possíveis responsáveis.

A regulação do metabolismo e o papel de moléculas-chave na simbiose ainda são pontos obscuros da fisiologia de fungos ectomicorrízicos. A elucidação dos mecanismos regulatórios envolvidos no metabolismo de compostos importantes à formação de ectomicorrizas abre inúmeras possibilidades de manipulação da simbiose visando ao aprofundamento de seu estudo e à sua aplicação em sistemas de produção florestal.

Nos fungos filamentosos, a subunidade α da proteína G é de fundamental importância na regulação de vários processos morfológicos, de desenvolvimento e de patogenicidade (Zuber *et al.*, 2003). Em *Aspergillus nidulans*, FadA foi caracterizada como a subunidade $G\alpha$ que apresenta papel-chave na regulação da germinação conidial e da produção de metabólitos secundários (Zuber *et al.*, 2003). Recentemente, identificou-se uma nova subunidade $G\alpha$ codificada pelo gene *gasC* no fungo dimórfico *Penicillium marneffe*. GasC é uma subunidade $G\alpha$, classe III, que é similar à Gpa2 em *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, à Gpa3 em *Ustilago maydis*, à Gpa1 em *Cryptococcus neoformans*, à Gna3 em *Neurospora crassa*, dentre outras (Nakafuku *et al.*, 1988; Isshiki *et al.*, 1992; Tolkacheva *et al.*, 1994; Regenfelder *et al.*, 1997; Bölker, 1998; Kays *et al.*, 2000, citado por Zuber *et al.*, 2003). Mutantes *gasC*⁻ apresentam significativo atraso na germinação, enquanto as linhagens contendo o alelo *gasC*^{G45R} ativo apresentam taxa de germinação conidial significativamente mais elevada em comparação às do tipo selvagem (Zuber *et al.*, 2003). A importância da subunidade $G\alpha$ na germinação sugere papel potencial na percepção de sinais externos, transmitindo-os ao citoplasma para o desencadeamento do processo de germinação.

Diferenças na composição química da parede dos esporos ou na superfície hidrofóbica podem estar relacionadas com a permanência do fungo no estado de dormência (Pascual *et al.*, 2000). Os basidiósporos de *Pisolithus* sp. apresentam superfície externa hidrofóbica, além de parede complexa constituída de quatro

camadas distintas (Mims, 1980; Campos & Costa, 2010a). Essa característica é também compartilhada por outros basidiomicetos, a exemplo de *Rhizopogon roseolus* (Shimomura *et al.*, 2008). A camada mais externa é elétron-densa e contém espículas superficiais de, aproximadamente, 1 μm (Campos & Costa, 2010a). Durante o amadurecimento dos basidiósporos, as outras três camadas tornam-se mais espessas, dificultando a preparação para a microscopia eletrônica de transmissão (Mims, 1980). A composição química da parede de basidiósporos de *Pisolithus* ainda não é conhecida, enquanto que a do micélio é constituída principalmente por glicanas, tipo β -1,4 e β -1,3, e quitina (Santos, 2007). Essas características explicam, pelo menos parcialmente, as baixas taxas de germinação observadas para os esporos desse grupo de micro-organismo.

A ausência de núcleo no interior de grande parte dos basidiósporos foi hipotetizada como um dos fatores responsáveis pelas baixas taxas de germinação dessas estruturas (Mims, 1980; Costa, 2002). No entanto, em estudo recente sobre a dinâmica nuclear durante a formação dos basidiósporos, demonstrou-se que todos os basidiósporos recebem um núcleo haplóide após a mitose pós-meiótica, evidenciando que outros fatores distintos devem influenciar a germinação (Campos & Costa, 2010a).

Da mesma forma, a presença de compostos de reserva pode constituir indicativo do grau de preparação dos esporos para a germinação. Nos fungos micorrízicos arbusculares, os lipídeos de reserva são compostos importantes para que a germinação ocorra de maneira eficaz, permitindo que o fungo se estabeleça no ambiente. Durante a germinação são requeridas elevadas quantidades de carbono e de energia, o que induz a mobilização das reservas lipídicas (Bago *et al.*, 2002).

Os lipídeos são compostos altamente reduzidos e pouco hidratados (Nelson & Cox, 2000). Essa característica permite maior armazenamento de energia dentro da célula, com menor ocupação do espaço intracelular. Novos constituintes celulares podem ser sintetizados a partir de compostos lipídicos de reserva por meio de uma primeira reação mediada pelas TAG (triacilglicerídeo) lipases (Daum *et al.*, 2007) e subsequente oxidação dos ácidos graxos pela β -oxidação, produzindo acetil-CoA. Esse composto é então utilizado em via alternativa ao ciclo de Krebs, denominada ciclo do glioxilato, sem a ocorrência de perda de carbono como CO_2 .

O metabolismo de lipídeos durante a germinação de esporos de fungos ectomicorrízicos não foi ainda estudado. Contudo, a confirmação da atividade da malato sintase em basidiósporos de diversos homobasidiomicetos (Ruch *et al.*, 1991) e a ocorrência dessa enzima e da isocitrato liase no basidiocarpo de *P. microcarpus*

(Campos, 2008) sugerem a importância do ciclo do glioxilato durante o processo de germinação de esporos. Corroboram essa hipótese a proximidade física entre mitocôndrias e corpúsculos lipídicos nos esporos fúngicos (Greuter & Rast, 1975; Ruch & North, 1987).

A basidiosporogênese em *Pisolithus* spp. é caracterizada pelo acúmulo de lipídeos durante o desenvolvimento dos basidiósporos, culminando com a formação de uma grande gota lipídica no interior dos esporos maduros (Mims, 1980; Campos *et al.*, 2008). O ácido graxo encontrado em maior proporção em *P. microcarpus* é o ácido oléico (Campos *et al.*, 2008). Da mesma forma, os lipídeos constituem a maior parte das reservas de carbono presentes nas hifas vegetativas de alguns fungos ectomicorrízicos (Martin *et al.*, 1984; Laczko *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2008). Os corpúsculos lipídicos observados no interior das hifas, basídios e basidiósporos de *Pisolithus* sp. (Campos *et al.*, 2008) podem estar relacionados ao transporte de carbono visando à formação dos basidiósporos.

Compostos de reserva como glicogênio, polissacarídeos, proteínas e RNA também foram observados na constituição dos basidiósporos (Campos & Costa, 2010b). O glicogênio está presente em pequena quantidade dentro dos basidiósporos maduros. Possivelmente, esse fato pode ser justificado pela utilização desse composto visando à síntese de constituintes celulares dos basidiósporos. Ressalta-se, no entanto, que a pequena quantidade de glicogênio contida nos basidiósporos de *P. microcarpus* pode ser especialmente importante para o suprimento da demanda energética nas fases iniciais da germinação, antes da mobilização das reservas lipídicas.

Durante o processo de formação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, a análise por microscopia de fluorescência revelou que o RNA total está presente no interior dos basídios jovens e diminui com o decorrer do desenvolvimento dos basidiósporos até não ser mais detectado por essa técnica após a maturação. O RNA total, observado no citoplasma de basidiósporos jovens, limita-se à região periférica do citoplasma quando esses atingem a maturidade. Possivelmente, a presença de RNA dentro dos basidiósporos pode refletir a necessidade de ocorrência de síntese protéica no início do processo de germinação (Campos & Costa, 2010b).

Para elucidar os vários processos desencadeados durante a germinação de esporos em diferentes espécies fúngicas, ferramentas moleculares tais como a técnica de hibridização subtrativa, a construção de biblioteca de cDNAs e análise de *ESTs* (*expressed sequence tags*), a RT-PCR e a qPCR, vêm sendo utilizadas em larga

escala (Thomas *et al.*, 2001; Stommel *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2010).

A construção da biblioteca de cDNA e análise de *ESTs* permitem caracterizar os genes presentes em etapas do ciclo de vida fúngico, sendo possível traçar o perfil transcricional em cada etapa, com a identificação dos transcritos mais abundantes (Voiblet *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2003; Abu *et al.*, 2004; Zahiri *et al.*, 2005; Acioli-Santos *et al.*, 2008).

Em *N. crassa*, 1287 genes com nível de expressão detectável durante a germinação conidial foram identificados (Kasuga *et al.*, 2005). O perfil transcricional de conídios em processo de germinação apresenta correlação significativa com os eventos bioquímicos envolvidos no processo. Dessa forma, pode-se inferir que o mRNA estocado no interior dos conídios é responsável pela codificação de proteínas envolvidas na germinação e, conseqüentemente, correlaciona-se com as atividades celulares desencadeadas durante esse processo (Kasuga *et al.*, 2005). A comparação do perfil transcricional durante a germinação de esporos de *N. crassa*, *U. maydis* e *Dictyostelium discoideum* revelou que o mesmo conjunto de genes ortólogos foi ativado e desativado em momentos idênticos durante a germinação dos esporos, sugerindo que alguns mecanismos relacionados ao processo são, em geral, conservados ao longo da evolução (Kasuga *et al.*, 2005).

Em *Blumeria graminis* foram identificados genes que codificam hipoteticamente proteínas homólogas à calmodulina e a cinase dependente de calmodulina, as quais podem estar relacionadas às vias de sinalização que regulam a germinação dos conídios. Genes relacionados à biossíntese de lisina e à biossíntese de aminoácidos sulfurados foram também identificados durante a germinação, sendo provavelmente essenciais para essa etapa do ciclo de vida fúngico. Durante a germinação, foram também identificados alguns genes que codificam produtos relacionados ao catabolismo das reservas lipídicas, ao metabolismo de trealose e ao metabolismo de glicogênio (Thomas *et al.*, 2001).

Duas *ESTs*, correspondentes aos genes *mnh6* e *mgatg1*, foram identificadas durante a análise da germinação de conídios e formação de apressório em *Magnaporthe oryzae*. O gene *mnh6* foi silenciado, resultando na redução do crescimento micelial e conidial, redução no desenvolvimento do apressório e, também, da patogenicidade. Em mutante Δ *mgatg*, observou-se bloqueio da autofagia, redução no número de gotas lipídicas dentro dos conídios, atraso no início da germinação e, mesmo quando essa era iniciada, ocorreu mais lentamente, sugerindo que de alguma

forma o produto do gene *mgatg1* tem grande importância para a germinação conidial de *M. oryzae* (Liu *et al.*, 2008). Anteriormente, o gene *mga1* de *M. grisea*, com papel na germinação dos conídios, já havia sido identificado (Gupta & Chattoo, 2007). Em linhagens Δ *mga1*, a mobilização de glicogênio e de lipídeos foi prejudicada durante a formação e desenvolvimento do apressório (Liu *et al.*, 2008).

A quantificação e a identificação de genes a partir do mRNA estocado no interior de conídios dormentes de *Aspegillus fumigatus* revelou a maior presença de transcritos classificados nas seguintes categorias: atividade regulatória de transcrição, ligação a RNA, metabolismo de fosfato e álcool (Lamarre *et al.*, 2008). Em outra avaliação constatou-se variação de 10% do número total de transcritos entre conídios jovens e velhos. Esse resultado indica que os mesmos mRNA estão presentes em concentrações similares nos conídios mesmo após um ano de armazenagem. Aos 30 minutos após a inoculação dos conídios em meio de cultura, constatou-se a ativação de 787 genes, diferentemente do ocorrido após 60 minutos e 90 minutos, quando observaram-se 176 e 109 genes expressos diferencialmente, respectivamente. Esses dados indicam que a mudança transcricional mais significativa ocorre nos primeiros momentos da germinação. Genes cujos produtos estão relacionados à transcrição, à biossíntese de purinas e pirimidinas, à síntese protéica, à biogênese ribossomal e às modificações pós-traducionais tiveram expressão regulada positivamente durante a fase inicial de germinação (Lamarre *et al.*, 2008).

Observou-se também regulação positiva de genes codificadores de proteínas envolvidas no ciclo de Krebs e de genes mitocondriais, conjuntamente com a regulação negativa de genes codificadores de proteínas envolvidas no metabolismo fermentativo, a exemplo da lactato desidrogenase e da piruvato descarboxilase. Essas observações sugerem que a saída dos conídios da dormência está relacionada à transição do metabolismo fermentativo para o metabolismo aeróbico (Lamarre *et al.*, 2008).

Para identificar os mRNAs estocados no interior de esporos de *Gigaspora rosea*, construiu-se biblioteca de cDNA, obtendo-se o total de 1500 clones, dos quais 50 foram sequenciados aleatoriamente (Stommel *et al.*, 2001). Dezesesseis seqüências de aminoácidos deduzidas de algumas *ESTs* não apresentaram similaridade a qualquer proteína depositada no banco de dados do NCBI. No entanto, foram identificadas 10 outras que apresentaram similaridade com proteínas envolvidas no processamento do mRNA armazenado no núcleo dos esporos, na tradução de proteínas funcionais e também nas modificações pós-traducionais. Essas observações indicam que possivelmente a síntese protéica e os processos conjuntamente

envolvidos são de fundamental importância durante os primeiros passos da germinação dos esporos. As sequências de aminoácidos deduzidas das demais *ESTs* demonstraram similaridade com proteínas envolvidas na síntese de DNA, no ciclo celular, na transdução de sinal e nos processos de transporte e de respiração (Stommel *et al.*, 2001).

Para *P. microcarpus*, ainda não foram relatadas quaisquer informações sobre as moléculas de mRNA presentes no interior dos basidiósporos (Campos & Costa, 2010b) e a possível função dos transcritos. No entanto, hipotetiza-se que os basidiósporos de *P. microcarpus* armazenam em seu interior transcritos relacionados à síntese protéica, como observado em esporos do fungo micorrízico arbuscular *G. rosea* (Stommel *et al.*, 2001) e também em conídios de *A. fumigatus* (Lamerre *et al.*, 2008), importante durante a etapa de germinação, e também transcritos relacionados à mobilização de ácidos graxos, composto de reserva mais abundante nessa estrutura (Campos *et al.*, 2008).

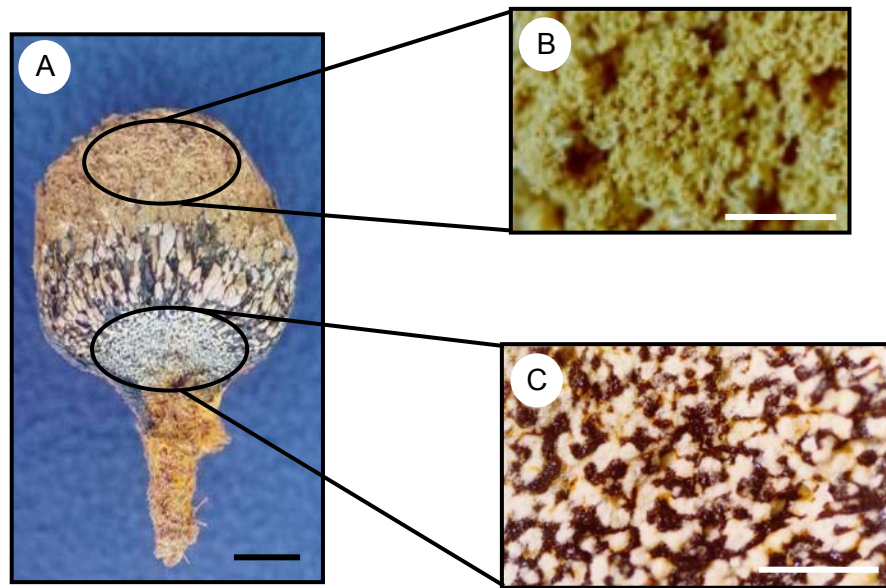
A identificação e caracterização dos mRNA presentes no interior dos basidiósporos de *P. microcarpus* poderá fornecer informações sobre quais processos metabólicos estão envolvidos durante o evento de germinação desses propágulos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização do mRNA de basidiósporos e do micélio dicariótico de *P. microcarpus*

2.1.1. Coleta de basidiósporos e isolamento de dicários

Os basidiósporos de *P. microcarpus* (Figura 1 B) foram coletados a partir de um basidiocarpo (Figura 1 A) obtido em floresta de *Eucalyptus* spp. no Município de Viçosa, Estado de Minas Gerais, e armazenados a -80 °C, durante cerca de 6 meses. Para o isolamento do dicário, o basidiocarpo foi manualmente partido em capela de fluxo laminar e amostras da gleba foram coletadas com auxílio de uma pinça esterilizada. Quatro fragmentos da base do basidiocarpo, correspondendo à região de peridíolos não consolidados (Figura 1 C) e medindo aproximadamente 5 x 5 mm, foram inoculados em 10 placas de Petri, contendo meio Merlin Norklans Modificado (MNM) (Marx, 1969), em 4 pontos equidistantes, seguido de incubação a 28 °C. As placas foram examinadas diariamente visando à observação do crescimento de colônias características de *P. microcarpus* a partir dos fragmentos do basidiocarpo. Após a formação das colônias, fragmentos 5 x 5 mm foram retirados das bordas das colônias e transferidos para novo meio a fim de se obter culturas puras. As culturas foram mantidas em meio MNM (Marx, 1969), a 28 °C, sendo repicadas para novo meio a cada 30 dias.



Adaptado (Campos & Costa, 2010)

Figura 1. (A) Basidiocarpo de *Pisolithus microcarpus* cortado transversalmente. (B) Região caracterizada pela presença de basidiósporos maduros. (C) Região dos peritélios indiferenciados ou não-consolidados, caracterizada pela presença de regiões com hifas despigmentadas intercaladas com matriz polissacarídica escura. Barras: A = 1,5 cm; B = 0,25 mm; C = 2 mm.

2.1.2. Extração de RNA total, purificação de mRNA e síntese de cDNA de *P. microcarpus*

O micélio dicariótico foi cultivado por 25 dias a 28 °C em Placas de Petri contendo 20 mL de Meio MNM (Marx, 1969) recoberto com papel celofane esterilizado. Findo o período de incubação, os micélios foram recuperados do papel celofane e armazenados a -80 °C.

Para extração do RNA total, 100 mg de basidiósporos e de micélio dicariótico foram utilizados. A extração de RNA total foi procedida utilizando-se o kit *UltraClean™ Microbial RNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA.), conforme as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram avaliadas qualitativamente utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1% e quantitativamente por espectrofotometria. Para obtenção de 1 µg de RNA total foram procedidas 42 extrações utilizando-se basidiósporos e 8 extrações utilizando-se micélio dicariótico.

A purificação do mRNA e síntese de cDNA ss (fita simples) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se o kit *Improm-II Reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante.

2.1.3. Avaliação da presença de transcritos

Analisaram-se 14 transcritos cujos produtos estão envolvidos na mobilização de lipídeos, síntese de ácidos graxos, degradação de glicogênio, metabolismo de nitrogênio, mobilização de trealose, via glicolítica, degradação de glicanas e na via das pentoses fosfato (Tabela 1). As sequências utilizadas para escolha dos *primers* foram obtidas no banco de *EST* de *P. microcarpus* da Unité de Mixte de Recherche Intéraction Arbres/Microorganismes, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Nancy, França. Os *primers* utilizados foram determinados utilizando-se os programas Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), AmplyfX (<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplyfX>) e Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Tabela 1). O tamanho dos amplicons variou de 100 a 300 pb.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 1 µL de cDNA ss de basidiósporos e dicários, Tampão Go Taq Flexi Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleosídeos trifosfatados, 0,4 µM de cada *primer*, 1 U de Go Taq Flexi Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e água livre de nuclease q.s.p 12,5 µL. Para cada amostra foi preparado um controle negativo (NTC - *No-template control*). O programa utilizado para a amplificação das amostras foi o seguinte: 94 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma última etapa de 72 °C por 5 minutos. O produto da amplificação foi verificado em gel de agarose a 2%.

2.1.4. Análise da quantidade de transcritos

A quantificação de transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13* (Tabela 1) foi realizada por qPCR (PCR quantitativo), utilizando-se o método de quantificação relativa da curva-padrão (Larionov *et al.*, 2005). O controle endógeno utilizado para a normalização dos dados de expressão gênica foi escolhido após a avaliação da RT-PCR (transcriptase reversa - PCR) em gel de agarose a 0,8%.

A qPCR foi realizada usando SYBR Green para a detecção da fluorescência durante a amplificação no equipamento ABI PRISM 7500 *Sequence Detection System* (SDS) com o software ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram realizadas em volume de 25 µL contendo SYBR Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,2 µM de cada *primer* e 1 µL de cDNA ss.

Tabela 1. Primers utilizados para a análise da expressão gênica em basidiósporos e dicários de *P. microcarpus*

Gene	Produto	Forward (5'→ 3')	Reverse (5'→ 3')	Amplicon ^{3/}	Atuação
<i>tub</i> ^{1/}	α-tubulina	CGGATCAAGGCTTCACGACATTCT	CGAGCGTAGTTATTGGCAGCGTAT	181	Citoesqueleto– microtúbulos
<i>gpd</i> ^{2/}	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	GCTTTCCGTGTACCTACCCTTGAT	CACTCTTGTGCGTACCAAGCGATGA	208	Glicólise
<i>fas</i> ^{1/}	Sintetase de Ácidos Graxos	AAAGATGGTCCGCCATACAG	GAAGTTCGGCTCAACGAAAG	258	Síntese de TAG
<i>d15fa</i> ^{2/}	Ácido graxo-Δ ¹⁵ desaturase	TGGGCTATGAACCTCTCACCAAGT	CCTTGAAGGCGAGGTTGTGTGTA	192	Síntese de TAG
<i>mfp</i> ^{1/}	Proteína multifuncional da beta-oxidação	CCCCTCACAACTACTCGTTTTCCG	ATCGGCTCGCACTCAGGGTTT	210	Degradação de TAG
<i>32ei</i> ^{4/}	D ³ , D ² -enoyl-CoA desidrogenase	TGTACGTAGCTTTACGGAGGTTG	TGACTGCCAGGAACTCTTTGGAT	214	Degradação de TAG
<i>gp</i> ^{1/}	Glicogênio fosforilase	GGAAGACTTCGCTACCAACA	CATCTCCGAAAAGTCCAGATGA	106	Degradação de glicogênio
<i>gogat</i> ^{4/}	Glutamato sintase dependente de NADPH	CGGCTGTCAGCACCAACA	CTGTCTATTTAAAGGCGAGCGTAA	100	Assimilação de nitrogênio
<i>gs</i> ^{1/}	Glutamina sintase	TTACCGCTATCACGCCAACA	TGTACCATCGGCATCCAACA	100	Assimilação de nitrogênio
<i>ntrh</i> ^{2/}	α-trealase (hipotética)	AGTAGACCGGGCTTAGGGTTCA	CCCGTGACAAACCCCATATG	100	Catabolismo da trealose
<i>6-pfk</i> ^{4/}	6-fosfofrutocinase	AGGTCGACGCTGGGTAAGG	ACGGCGCTATCCACGAAC	100	Glicólise
<i>pyk</i> ^{1/}	Piruvato cinase	GTCTCGCAAGGGCGTCAA	GACGCCATTCTAACACCAAAA	100	Glicólise
<i>ag13</i> ^{2/}	α-1,3-glicosidase (hipotética)	GTCTCGCAAGGGCGTCAA	GACGCCATTCTAACACCAAAA	100	Degradação de glicano
<i>6-pgd</i> ^{4/}	6-fosfogluconato desidrogenase	GTCTCGCAAGGGCGTCAA	GACGCCATTCTAACACCAAAA	100	Via das pentoses fosfato

^{1/} Primers utilizados para a avaliação da presença/ausência dos genes.

^{2/} Primers utilizados para a avaliação da presença/ausência dos genes e também da expressão gênica pela qPCR.

^{3/} Tamanho do amplicon obtido.

Cada amostra foi amplificada em triplicata utilizando-se o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Para avaliar a formação de dímeros dos *primers* e amplificações inespecíficas, ao final da amplificação procedeu-se a construção de uma curva de desnaturação. Em cada placa de qPCR foram incluídos o controle negativo (NTC- *No-template control*) e a curva-padrão de cada gene. As curvas-padrão foram realizadas a partir da diluição 10^{-5} até 10^{-9} do cDNA ds de cada gene. A quantificação relativa (RQ) foi obtida dividindo-se o nível de expressão normalizado de cada gene de interesse nos basidiósporos pelo nível de expressão normalizado do gene na amostra calibradora (dicário).

Os transcritos referentes à α -tubulina e à gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase são expressos constitutivamente e foram adotados como normalizadores nas análises de qPCR (Figura 3). O transcrito que apresentou melhor amplificação e tamanho correspondente ao esperado (Figura 3) foi o da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, dessa forma foi escolhido para a normalização da quantificação dos transcritos na análise de qPCR.

A quantificação dos transcritos dos genes foi realizada pelo método da quantificação relativa da curva-padrão. Curvas-padrão foram construídas para cada gene e, por atenderem aos parâmetros que garantem a confiabilidade dos resultados, foram consideradas satisfatórias para análise de qPCR (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de eficiência de amplificação dos *primers* (EA(%)), coeficiente angular da reta (*Slope*) e coeficiente de determinação (R^2) referentes à curva padrão de dos transcritos analisados pela técnica qPCR.

Genes	EA(%)	<i>Slope</i>	R^2
<i>d15fa</i>	85,904	-3,714	0,999
<i>ntrh</i>	99,441	-3,335	0,999
<i>ag13</i>	85,354	-3,731	0,995
<i>gdp</i>	92,239	-3,523	0,998

^{1/} Valor aceitável para a eficiência de amplificação deve estar entre 80 e 100 (%).

^{2/} Valor aceitável para o *slope* deve estar entre -3,32 e -3,9.

^{3/} Valor aceitável para R^2 é $\geq 0,99$.

2.1.5. Síntese de cDNA, clonagem e construção da biblioteca de cDNA total de basidiósporos

Para a construção da biblioteca, cDNA ds (fita dupla) foi sintetizado a partir de 300 ng de RNA total dos basidiósporos utilizando-se o kit *SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit* (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante, sendo conduzidas 20 ciclagens na etapa da LD-PCR.

O produto da reação foi inserido em vetor pGEM-T *Easy* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e usados para transformar células ultracompetentes de *Escherichia coli* DH5 α , segundo Inoue *et al.* (1990). Os clones bacterianos recombinantes foram selecionados em meio LB contendo ampicilina (50 μ g/mL) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) (16 μ g/mL) (Sambrook *et al.*, 2001). Vinte clones recombinantes foram selecionados aleatoriamente para confirmação da presença de inserto. Para tal, o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante, e submetido à reação de hidrólise utilizando a enzima de restrição *EcoRI*. A reação de hidrólise correspondeu a 2 μ L de DNA plasmidial, 1 U da enzima *EcoRI*, 2 μ L de Tampão H dez vezes concentrado, específico para a enzima, e água Milli-Q q.s.p 20 μ L. Os tubos foram incubados durante a noite a 37 °C e, subsequentemente, 5 minutos a 70 °C. As reações foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

2.1.6. Sequenciamento e anotações das sequências

Previamente ao sequenciamento, 500 clones selecionados aleatoriamente foram submetidos à técnica de lise rápida para confirmar a presença de inserto. Para tal, os clones selecionados foram estriados em placas contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (60 μ g/mL) e X-Gal (16 μ g/mL). As placas foram incubadas por 12-16 horas a 37 °C. Após o crescimento bacteriano, parte da cultura resultante da estria de cada clone foi transferida, com o auxílio de palitos previamente esterilizados, para tubo Eppendorf de 0,5 mL, contendo 40 μ L de solução de lise rápida (Tris- HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; NaOH 100 mM e SDS 1%). Os tubos permaneceram à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 μ L de HCl 1 M e 5 μ L de azul de bromofenol. As amostras foram incubadas a -80 °C por 20 minutos, centrifugadas a 14000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi então submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Após esse procedimento, foram selecionados 288 clones dos quais o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), conforme as instruções do fabricante. O material obtido por meio da extração foi sequenciado pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se o kit *DYEnamic ET Dye Terminators* (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha), o sequenciador automático MegaBACE 1000 de 96 capilares (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha) e o *BigDye™ terminator cycling* (Macrogen, Inc., Korea) e o sequenciador automático 3730XL (Macrogen, Inc., Korea).

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pela análise do eletroferograma utilizando-se o programa CLC Genomics Workbench, versão 4.0 (CLC bio). As sequências provenientes do vetor e adaptadores foram removidas utilizando-se o programa CLC Genomics Workbench, versão 4.0 (CLC bio). O programa CAP3 foi utilizado para agrupar as sequências representadas mais de uma vez (Huang & Madan, 1999). Os contíguos e as sequências únicas foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se os algoritmos BLASTx e BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Presença de transcritos envolvidos no metabolismo de lipídeos, glicogênio, trealose, nitrogênio, via glicolítica e via das pentoses fosfato no micélio e nos basidiósporos de *P. microcarpus*

A PCR realizada a partir de cDNA, usando *primers* determinados com base nas sequências de *ESTs* de *P. microcarpus* disponíveis, revelou a presença de 14 transcritos comuns ao micélio dicariótico e aos basidiósporos fúngicos (Figura 3).

Os transcritos dos genes *mfp* e *32ei*, detectados nesse estudo, codificam a proteína multifuncional da β -oxidação (EC 2.3.1.86) e a D³, D²-enoyl-CoA isomerase (EC 4.2.1.17), respectivamente (Figura 2). Essas duas enzimas estão envolvidas no processo de beta-oxidação (Figura 2). A etapa de degradação de ácidos graxos de cadeia longa ocorre no interior dos peroxissomos a partir de ácidos graxos constituintes dos TAG (Maggio-Hall & Keller, 2004). A utilização de acetil-CoA pelo ciclo do glioxilato tem como produto final, compostos precursores, a exemplo de malato, succinato e glioxilato. Em *Laccaria bicolor*, genes responsáveis por esses mesmos transcritos estão presentes em copia única no genoma fúngico (Reich *et al.*, 2009).

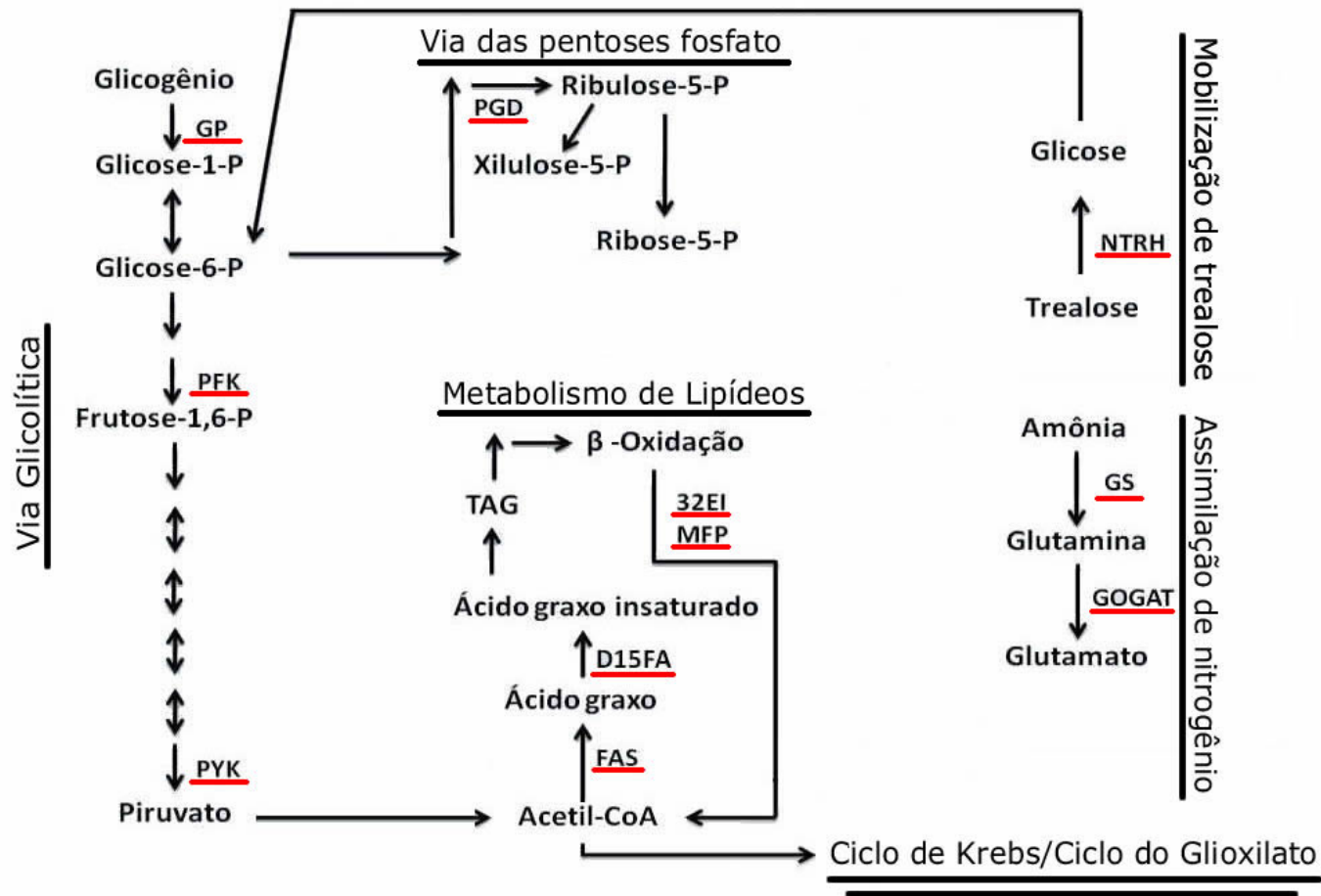


Figura 2. Enzimas relacionadas ao metabolismo de carbono e nitrogênio avaliadas no presente trabalho (sublinhadas em vermelho). GP = glicogênio fosforilase; PFK = fosfofrutocinase; PYK = piruvato cinase; PGD = 6-fosfogluconato desidrogenase; 32EI = D³, D²-enoyl-CoA desidrogenase; MFP = proteína multifuncional da beta-oxidação; D15FA = ácido graxo-Δ¹⁵ desaturase; FAS = sintetase de ácidos graxos; NTRH = α-trealase; GS = glutamina sintetase; GOGAT = glutamato sintase dependente de NADPH.

Durante a basidiosporogênese em *P. microcarpus*, a transcrição dos genes *mfp* e *32ei* é regulada positivamente, sugerindo que os compostos lipídicos são fontes de energia e carbono para a síntese de compostos precursores utilizados durante a formação dos basidiósporos (Campos, 2008).

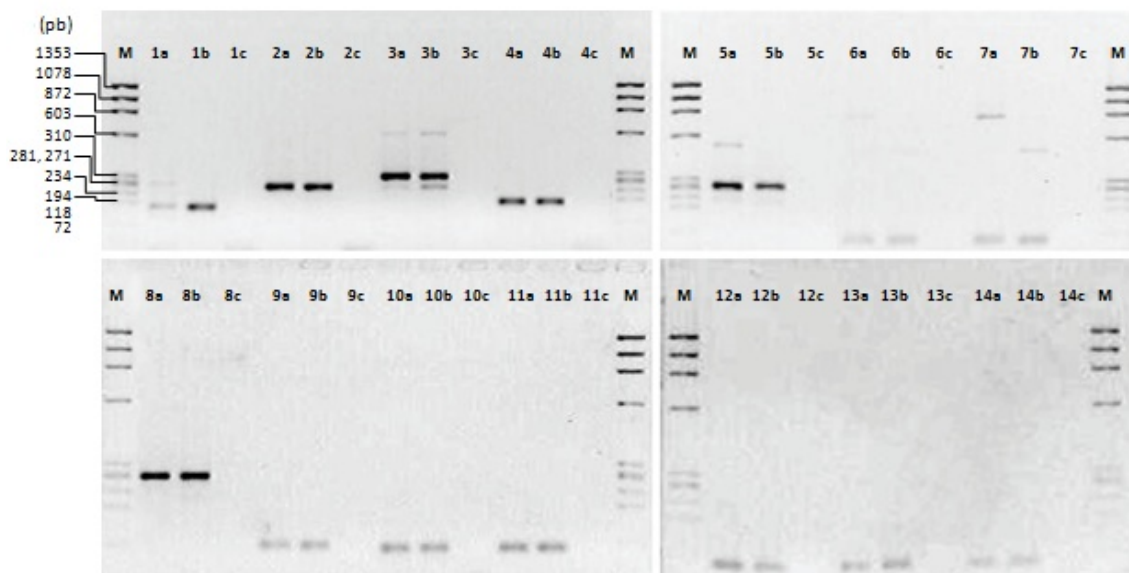


Figura 3. Produto de PCR dos transcritos correspondentes aos genes analisados. a = cDNA de micélio dicariótico; b = cDNA de basidiósporos; c = controle negativo (NTC). M = Marcador Molecular (Φ X174 DNA); 1 = α -tubulina (*tub*); 2 = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gpd*); 3 = sintetase de ácidos graxos (*fas*); 4 = ácido graxo- Δ^{15} desaturase (*d15f*); 5 = proteína multifuncional da beta-oxidação (*mfp*); 6 = α -1,3-glicanase (*ag13*); 7 = 6-fosfoglucanato desidrogenase (*6-pgd*); 8 = D³, D²-enoyl-CoA desidrogenase (*32ei*); 9 = glicogênio fosforilase (*gp*); 10 = glutamato sintetase dependente de NADPH (*gogat*); 11 = glutamina sintetase (*gs*); 12 = α -trealase (*ntrh*); 13 = 6-fosfofrutocinase (*6-pfk*); 14 = piruvato cinase (*pyk*).

No presente trabalho foi identificada a presença de transcritos codificadores dessas duas enzimas nos basidiósporos (Figura 3). Assim, infere-se que os ácidos graxos provenientes dos corpúsculos lipídicos presentes nos basidiósporos (Campos *et al.*, 2008) podem ser utilizados na síntese de precursores necessários ao início do processo de germinação de esporos.

O transcrito referente à sintetase de ácidos graxos (EC 2.3.1.86) foi encontrado nos basidiósporos e no micélio (Figura 3). A enzima, codificada pelo gene *fas*, participa da síntese de ácidos graxos de cadeia longa e atua na etapa inicial da síntese de lipídeos de reserva (Figura 2). Em *L. bicolor*, foram identificados 5 membros da família do gene *fas*, no entanto, apenas uma só cópia apresenta nível de transcrito detectável, podendo ser a única responsável pela catálise da reação correspondente durante a biossíntese de ácidos graxos (Reich *et al.*, 2009).

A transcrição do gene *fas* é regulada positivamente durante o processo de formação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, principalmente nas etapas finais de maturação dos esporos (Campos, 2008). Sugere-se que a presença desses transcritos seja resultante da síntese de ácidos graxos no interior dos basidiósporos nas etapas finais de basidiosporogênese.

Verificou-se a presença de transcritos do gene referente à glicogênio fosforilase (EC 2.4.1.1) nos basidiósporos de *P. microcarpus* (Figura 3). Sustenta esse resultado a constatação da presença de glicogênio nos basidiósporos (Campos & Costa, 2010b). Possivelmente, o glicogênio deve suprir a demanda energética basal do basidiósporo até que outras reservas sejam mobilizadas.

A glicogênio fosforilase catalisa a quebra do glicogênio estocado na célula a glicose 1-fosfato, composto que será posteriormente direcionado à glicólise ou às vias biossintéticas (Figura 2). A vantagem dessa reação é a obtenção de glicose a partir de glicogênio sem gasto de ATP (Laere, 1995). A concentração de glicose no citoplasma irá determinar a ativação ou repressão da atividade enzimática. Altas concentrações de glicose promovem a desfosforilação da enzima e sua consequente inativação. Por outro lado, em baixas concentrações de glicose, a enzima é fosforilada e passa a gerar moléculas de glicose 1-fosfato a partir do substrato (Laere, 1995).

A glicogênio fosforilase foi identificada em *L. bicolor* (Martin *et al.*, 2008), sendo regulada positivamente nas ectomicorrizas em função, possivelmente, da maior necessidade de energia durante a formação e o estabelecimento da associação (Deveau *et al.*, 2008).

Transcritos responsáveis pela codificação das enzimas glutamato sintase dependente de NADPH (EC 1.4.1.13) e glutamina sintetase (EC 6.3.1.2), envolvidas na assimilação de nitrogênio, foram encontrados no interior dos basidiósporos de *P. microcarpus* (Figura 3). A primeira enzima atua na assimilação de amônia à glutamina e a segunda na conversão de glutamina à glutamato, composto precursor para a síntese de outros compostos nitrogenados na célula. A presença desses transcritos no interior dos basidiósporos sugere a provisão para a síntese de compostos nitrogenados orgânicos, principalmente aminoácidos, durante a germinação dos esporos. Sustenta essa hipótese o aumento da expressão do gene referente à glutamato sintase nos 30 minutos iniciais da germinação conidial de *A. fumigatus* (Lamarre *et al.*, 2008).

A presença de transcritos codificadores de enzimas da via glicolítica foi também verificada nos basidiósporos (Figura 3). A presença desses transcritos indica

a possibilidade de síntese de ATP a partir do carbono armazenado nos basidiósporos e o suprimento de intermediários da via glicolítica para a biossíntese de constituintes celulares durante a germinação. Duas enzimas-chave, cujas reações são consideradas fisiologicamente irreversíveis, são a 6-fosfofrutocinase (EC 2.7.1.11) e a piruvato cinase (EC 2.7.1.40), codificadas pelos genes *6-pfk* e *pyk*, respectivamente (Figura 2). A enzima 6-fosfofrutocinase atua na catálise do processo de transferência do grupo fosfato do ATP para a frutose-6-fosfato, sendo esse o ponto mais importante de controle da glicólise. A piruvato cinase é responsável por catalisar a reação de transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para a molécula de ADP, gerando ATP (White, 2000).

Os genes codificadores para as enzimas PFK e PYK foram também identificados no genoma de *L. bicolor*, organismo filogeneticamente próximo a *P. microcarpus* (Martin *et al.*, 2008). Esses genes são regulados positivamente durante a formação e o estabelecimento das ectomicorrizas, o que indica alta atividade metabólica nessas etapas do ciclo de vida fúngico (Deveau *et al.*, 2008).

Outro transcrito identificado nos basidiósporos de *P. microcarpus* foi o correspondente à 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44), enzima importante na via das pentoses fosfato (Figura 2 e 3). Essa via é importante na produção de precursores para a síntese de ribose e desoxirribose, constituintes dos ácidos nucléicos. A eritrose fosfato, também produzida por essa via, é composto precursor na biossíntese de aminoácidos aromáticos. A via das pentoses fosfato também é responsável por gerar NADPH, utilizado em várias vias biossintéticas (White, 2000). A reação catalisada por essa enzima é de β -descarboxilação do 3-ceto-6-fosfogluconato, intermediário ceto formado a partir da oxidação do 6-fosfogluconato, transferindo elétrons para o NADP^+ . Após essa reação, ocorre a formação de ribulose 5-fosfato, precursora da formação da ribose 5-fosfato, constituinte dos nucleotídeos, e de fosfogliceraldeído e frutose-6-fosfato, intermediários da via glicolítica. Em *L. bicolor*, o gene codificador para a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase também foi identificado (Martin *et al.*, 2008).

3.2. Análise por qPCR dos transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13*

A análise por qPCR evidenciou a presença de maior quantidade de transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13* nos basidiósporos do que no micélio dicariótico (Figura 4).

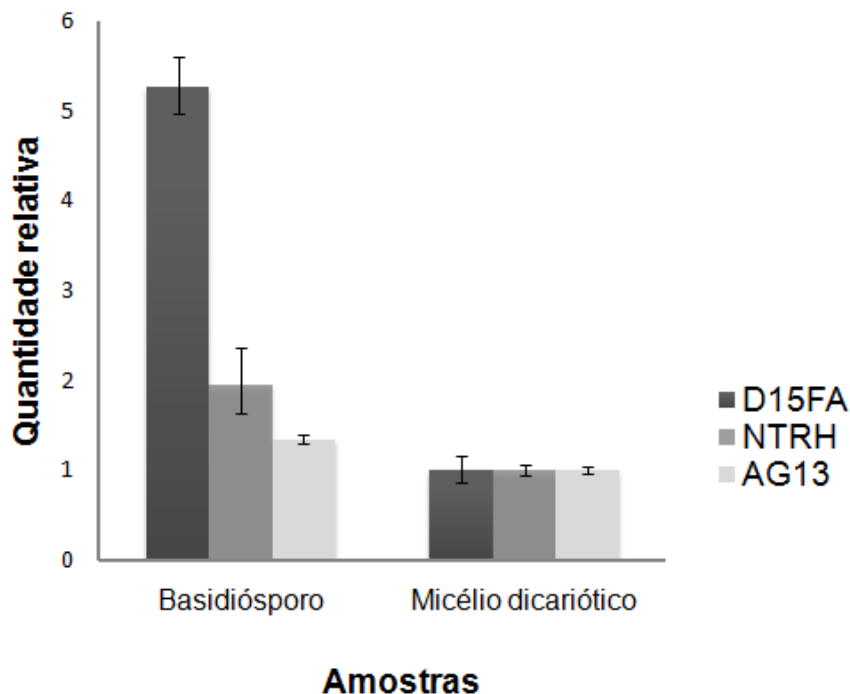


Figura 4. Quantidade relativa dos transcritos dos genes *d15fa*, *ntrh* e *ag13* em basidiósporos livres coletados de basidiocarpos de *Pisolithus microcarpus* em comparação com micélio dicariótico fúngico isolado do mesmo basidiocarpo e cultivado por 25 dias a 28°C em meio MNM.

A quantidade relativa mínima e máxima foram utilizadas para calcular o desvio padrão da expressão relativa de cada gene, representado graficamente na Figura 4. Como o micélio dicariótico foi utilizado como calibrador, o valor da quantidade relativa (QR) para essa amostra foi 1 (um) para os três genes avaliados.

Ao comparar os valores de QR (basidiósporo e micélio dicariótico) referente ao gene *d15fa*, verificou-se que os transcritos desse gene encontram-se em quantidade 5,309 vezes maior no basidiósporo do que no micélio (Tabela 3). O gene *d15fa* codifica para a enzima responsável pela inserção de duplas ligações em ácidos graxos, conhecida como ácido graxo- Δ^{15} desaturase (EC 1.14.19) (Figura 3). Essa enzima atua na síntese de ácidos graxos insaturados, etapa importante na síntese de TAG. O gene *d15fa* foi identificado em cópia única no micélio de *L. bicolor* (Reich *et al.*, 2009)

O valor de QR para os transcritos do gene *ntrh*, avaliado nos basidiósporos, foi de 2,071 vezes maior no basidiósporo (Tabela 3). O gene *ntrh* é responsável por codificar hipoteticamente proteína envolvida no metabolismo de trealose, a α -trealase neutra (EC 3.2.1.28), que desempenha função catalítica na conversão desse açúcar à D-glicose (Figura 3). A trealose pode ser usada pela célula para estocar e, ou transportar carbono e para a síntese de componentes celulares (Deveau *et al.*, 2008).

A germinação de esporos de várias espécies fúngicas pode estar diretamente associada à ativação da trealase. A ausência de trealase neutra reduz a germinação de esporos de *S. pombe*. Porém, outra enzima, a trealase ácida pode atuar na degradação de trealose nessa situação, dando suporte à etapa de germinação (Beltran *et al.*, 2000). Em mutante de *A. nidulans* com o gene da trealase neutra interrompido, os conídios apresentaram atraso na germinação em meio com limitação de carbono, sugerindo a importância da mobilização de trealose intracelular para suprir a necessidade energética durante a germinação dos esporos (d'Enfert *et al.*, 1999). Durante a germinação de ascósporos de *Pichia pastoris*, a trealase não é inibida pelos altos níveis de ATP na célula e atua rapidamente na quebra da trealose (Thevelein *et al.*, 1984). Nos ascósporos de *P. pastoris*, a trealose é a primeira fonte de energia para a respiração durante a germinação, enquanto os lipídeos serão preferencialmente utilizados durante a dormência (Thevelein *et al.*, 1984).

No presente estudo identificou-se maior quantidade de transcritos do gene *ntrh*, referente à α -trealase, em basidiósporos, indicando que, possivelmente, a trealose é também utilizada como fonte de energia durante o processo de germinação, mesmo que em menor quantidade, quando comparada aos compostos lipídicos (Figura 4).

Tabela 3. Valores de C_T Médio, quantidade relativa de transcritos (QR), quantidade relativa de transcritos mínima (QR Mín) e quantidade relativa de transcritos máxima (QR Máx) obtidos após análise de qPCR referentes às amostras de cDNA utilizadas e aos genes avaliados

Amostras	Genes avaliados	C_T Médio	QR	QR Mín	QR Máx
Esporo	<i>d15fa</i>	25,070	5,309	5,001	5,637
	<i>ntrh</i>	23,595	2,071	1,971	2,176
	<i>ag13</i>	23,974	1,338	1,288	1,391
Micélio	<i>d15fa</i>	27,837	1,000	0,862	1,160
	<i>ntrh</i>	24,718	1,000	0,936	1,068
	<i>ag13</i>	24,522	1,000	0,960	1,042

Já para o gene *ag13*, observou-se quantidade de transcritos 1,338 vezes maior no basidiósporo do que no micélio (Tabela 3). Os valores de QR para os basidiósporos e para o micélio dicariótico foram próximos (Tabela 3). No entanto, a diferença entre eles foi significativa.

O gene *ag13* codifica hipoteticamente a enzima α -1,3-glicosidase (EC 3.2.1.84) envolvida na degradação de glicanas. No presente trabalho, observou-se maior quantidade de transcritos desse gene nos basidiósporos (Figura 4). Esse fato sugere que a α -1,3-glicosidase pode ser importante durante o processo de germinação, atuando na catálise da reação de degradação de glicanas presentes na parede dos basidiósporos de *P. microcarpus* durante a germinação.

3.3. Análise da biblioteca de cDNA construída a partir de cDNA de basidiósporos de *P. microcarpus*

Para a caracterização do mRNA presente no interior dos propágulos de *P. microcarpus*, efetuou-se a construção de biblioteca de cDNA dos basidiósporos fúngicos. A biblioteca foi denominada de Bbl_Basidiósporos_Pm, sendo constituída do total de 1089 clones. Ao se avaliar o tamanho dos insertos por meio de reação de hidrólise do DNA plasmidial de 20 clones escolhidos aleatoriamente, pôde-se observar que a maioria dos clones analisados apresentaram inserto, com tamanho variando de 120 a 850 pb (Figura 5).

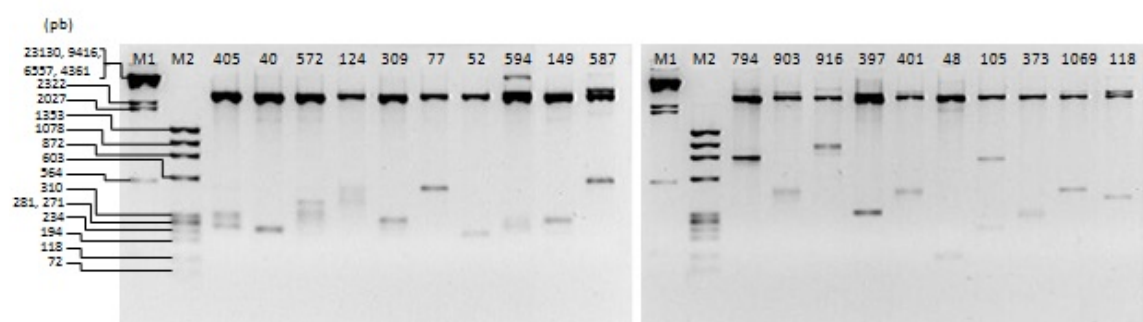


Figura 5. DNA plasmidial hidrolisado após reação com a enzima de restrição *EcoRI*. M1 = Marcador Molecular (λ Hind III); M2 = Marcador Molecular (Φ X174 DNA); As demais canaletas de ambos os géis correspondem aos clones avaliados. As bandas mais fortes, correspondentes a aproximadamente 3 kb, são os plasmídeos sem o inserto. As outras bandas mais claras, variando de tamanho para cada clone, são os insertos liberados do plasmídeo após a reação com enzima de restrição *EcoRI*.

Alguns clones, a exemplo 405 e 572, apresentaram mais de um fragmento, indicando a presença de sítios de restrição para a enzima utilizada no interior da sequência clonada. Após avaliação da presença de plasmídeos recombinantes e do tamanho dos fragmentos inseridos em número maior de clones por meio da técnica de lise rápida, 288 fragmentos de cDNA foram sequenciados. O total de 119 sequências foi analisado, sendo que as demais apresentavam apenas sequências do vetor, má qualidade ou, ainda, tamanho inferior a 100 pb.

Para identificar as sequências repetidas, agrupá-las em contíguos e identificar as sequências únicas utilizou-se o programa CAP3. Como resultado, foram obtidas 12 *ESTs*, correspondendo a 4 contíguos, e 8 sequências únicas (Figura 6). Os 4 contíguos construídos apresentaram tamanhos entre 365 e 726 pb, já as sequências únicas tiveram tamanhos variando de 111 a 395 pb (Tabela 4). Os contíguos 3 e 4 foram compostos por 34% e 52%, respectivamente, das sequências obtidas neste trabalho, e o 1 e 2, 2% e 5%. Poucas sequências únicas foram obtidas, o que representou 7% do total de sequências analisadas (Figura 6). A percentagem de redundância, expressa como o número de *ESTs* agrupadas/número total de *ESTs* (Peter *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2010), apresentou valor elevado de 89,2%. Esse fato indica a necessidade de se sequenciar novos clones da biblioteca a fim de se confirmar o baixo número de transcritos distintos na biblioteca construída. Semelhantemente, foi observada redundância de 85% em uma biblioteca de cDNA referente à fase de crescimento inicial das hifas de *Microbotryum violaceum* após a análise de 24000 sequências (Yockteng *et al.*, 2007).

A elevada redundância da biblioteca pode também ser atribuída hipoteticamente à baixa meia-vida das moléculas de mRNA, que varia de 15 minutos a alguns dias, a depender da espécie (Karp, 2005). Assim, os transcritos mais abundantes seriam mais facilmente detectados no decorrer do tempo do que os mais raros e, ou mais facilmente degradados. Pode-se especular que os transcritos essenciais à germinação devem apresentar-se em número de cópias mais elevado para que ainda estejam presentes durante a fase de germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus*.

As 12 *ESTs* encontradas nesta análise de agrupamento foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados do NCBI, considerando-se apenas organismos pertencentes ao reino Fungi e utilizando-se os algoritmos BLASTx e BLASTn. O valor p foi considerado significativo quando $<10^{-4}$ (Peter *et al.*, 2003).

Utilizando o algoritmo BLASTx, observou-se que apenas quatro *ESTs* apresentaram sequências de aminoácidos deduzidas com similaridade a proteínas depositadas no banco de dados, ainda assim apenas uma apresentou similaridade com valor $e < 10^{-4}$ (Tabela 4). A sequência de aminoácidos deduzida da *EST* referente ao clone 277 apresentou similaridade de 66% quando comparado à proteína mitocondrial de *S. cerevisiae* S288c, com um valor e de $4,36e^{-11}$ (Tabela 4). Essa proteína, chamada de Tar1p, possui massa molecular de 14,34 kD, sendo codificada pelo gene *TAR1*, que possui 124 códon (Coelho *et al.*, 2002). *Tar1p* é reprimido quando ocorrem desequilíbrios no processo de tradução de genes mitocondriais (disfunção respiratória), tendo papel protetor contra efeitos negativos advindos da produção de espécies reativas de oxigênio em excesso (Bonawitz *et al.*, 2008).

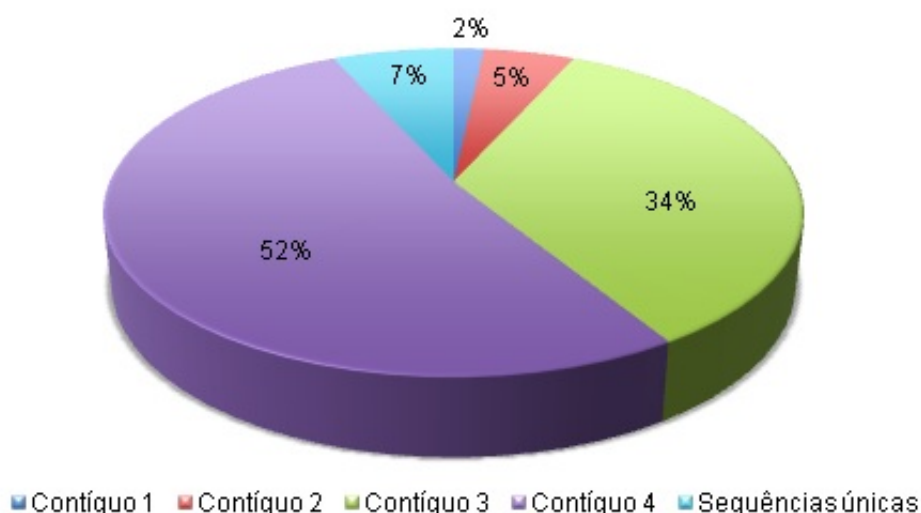


Figura 6. Distribuição de contíguos e sequências únicas entre os clones avaliados.

A caracterização de genes envolvidos na germinação de conídios de *Heterobasidium annosum*, fungo basidiomiceto, pela análise da biblioteca de cDNA, revelou a presença de um contíguo (52 sequências) cuja sequência de aminoácidos deduzida apresentou similaridade significativa com a proteína Tar1p (Abu *et al.*, 2004).

No presente trabalho, essa proteína foi também identificada também a partir de cDNA. Não se sabe qual papel da Tar1p nos basidiósporos de *P. microcarpus*. No entanto, sugere-se que a presença de transcritos no interior dessas estruturas seja possivelmente responsável por codificar proteína similar à Tar1p, podendo ser importante na proteção contra efeitos negativos de uma disfunção respiratória. Tal disfunção pode causar danos ao metabolismo respiratório e à biogênese de mitocôndrias.

Tabela 4. Avaliação da similaridade das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs da biblioteca de basidiósporos de *P. microcarpus* utilizando o algoritmo BLASTx

Clone/Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Valor e	Similaridade	Proteína hipotética	Organismo	Nº de sequências
Contig 1	365	XP_002173166	2,00e ⁻⁰²	31%	proteína hipotética conservada	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275	2
Contig 2	558	XP_001397935	4,00e ⁻⁰²	41%	proteína hipotética An16g06330	<i>Aspergillus niger</i>	6
Contig 3	652	-	sem similaridade	-	-	-	61
Contig 4	726	XP_001386217	4,00e ⁻⁰¹	27%	proteína hipotética rica em serina	<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 6054	40
72	111	-	sem similaridade	-	-	-	1
277	298	NP_690845	4,36e ⁻¹¹	66%	proteína mitocondrial	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1
335	205	-	sem similaridade	-	-	-	1
397	199	-	sem similaridade	-	-	-	1
401	124	-	sem similaridade	-	-	-	1
551	147	-	sem similaridade	-	-	-	1
851	395	-	sem similaridade	-	-	-	1
1047	145	-	sem similaridade	-	-	-	1

A utilização do algoritmo BLASTn revelou a existência de 8 *ESTs* com identidade a outras depositadas no banco de dados do NCBI superior a 90%. Apenas uma dessas *ESTs* apresentou valor *e* superior a 10^{-4} (Tabela 5).

Os contíguas 1, 2, 3 e 4, além do clone 851, apresentaram elevada identidade com uma *EST* de acesso GO447697, identificada na caracterização dos genes presentes no corpo de frutificação de *Ganoderma lucidum*, um basidiomiceto (Tabela 5).

A *EST* correspondente ao clone 277 apresentou valor *e* significativo de $2,00e^{-144}$ e identidade de 100% com outra *EST* de acesso CB011370, identificada na biblioteca de cDNA de micélio vegetativo de *P. microcarpus* (Tabela 5).

Foi identificada também uma *EST* correspondente ao clone 551 com identidade à sequência de acesso CU380083 de *M. violaceum*, com valor *e* inferior a 10^{-4} (Tabela 5).

O clone 401 apresentou similaridade a uma *EST* identificada em *N. crassa*, número de acesso G906P12FF7.T0, porém com um valor *e* superior a 10^{-4} (Tabela 5). No estudo do genoma de *N. crassa*, 41% das proteínas identificadas não apresentaram similaridade às proteínas depositadas no banco de dados, indicando que uma grande quantidade de genes fúngicos permanece desconhecida (Galagan *et al.*, 2003).

As *ESTs* referentes aos clones 397, 1047, 72 e 335, não apresentaram identidade a qualquer sequência nucleotídica depositada no banco de dados do NCBI.

As 11 *ESTs* identificadas no presente trabalho apresentaram sequências de aminoácidos deduzidas com valores *e* não significativos ou não tinham similaridade a qualquer proteína depositada no banco de dados (Tabela 4). Quando essas *ESTs* foram comparadas às sequências nucleotídicas utilizando o algoritmo BLASTn, observou-se alta similaridade de algumas delas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI. No entanto, as sequências de aminoácidos deduzidas das *ESTs* depositadas no banco de dados do NCBI também não apresentavam similaridade a qualquer outra proteína.

Tabela 5. Avaliação da identidade das *ESTs* da biblioteca de cDNA de basidiósporos de *P. microcarpus*, com identidade aos acessos do NCBI, utilizando o BLASTn

Clone/Contíguo	Tamanho (pb)	Acesso NCBI	Valor e	Identidade	EST	Organismo	Nº de sequências
Contig 1	365	GO447697	3,60e ⁻⁸⁸	98%	GL_FB_0567	<i>Ganoderma lucidum</i>	2
Contig 2	558	GO447697	0,00e ⁻⁰⁰	91%	GL_FB_0567	<i>Ganoderma lucidum</i>	6
Contig 3	652	GO447697	0,00e ⁻⁰⁰	100%	GL_FB_0567	<i>Ganoderma lucidum</i>	61
Contig 4	726	GO447697	0,00e ⁻⁰⁰	96%	GL_FB_0567	<i>Ganoderma lucidum</i>	40
72	111	-	sem identidade	-	-	-	1
277	298	CB011370	2,00e ⁻¹⁴⁴	100%	P072H07	<i>Pisolithus microcarpus</i>	1
335	205	-	sem identidade	-	-	-	1
397	199	-	sem identidade	-	-	-	1
401	124	GH049917	1,50e ⁻⁰¹	100%	G906P12FF7.T0	<i>Neurospora crassa</i>	1
551	147	CU380083	4,05e ⁻³⁰	95%	CU380083	<i>Microbotryum violaceum</i>	1
851	395	GO447697	4,91e ⁻¹⁴³	96%	GL_FB_0567	<i>Ganoderma lucidum</i>	1
1047	145	-	sem identidade	-	-	-	1

A identificação de *ESTs* cujas sequências de aminoácidos deduzidas não apresentaram similaridade às proteínas depositadas no banco de dados do NCBI já foi observada durante a análise de bibliotecas de cDNA de outros organismos (Thomas *et al.*, 2001; Voiblet *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2003; Abu *et al.*, 2004; Zahiri *et al.*, 2005; Acioli-Santos *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010). Essas observações ressaltam a falta de informações sobre basidiomicetos e, em especial, sobre os fungos ectomicorrízicos, revelando a necessidade de se realizar mais estudos visando à identificação de genes expressos durante a basidiosporogênese.

Sugere-se que as *ESTs* identificadas no presente trabalho cujas sequências de aminoácidos deduzidas não apresentaram similaridade às proteínas depositadas no banco de dados do NCBI sejam características da espécie fúngica ou dos basidiósporos.

CONCLUSÕES

1. Moléculas de mRNA estão presentes no interior dos basidiósporos de *P. microcarpus*.
2. Transcritos referentes às enzimas importantes na via glicolítica, via das pentoses-fosfato, assimilação de nitrogênio, mobilização e síntese de corpúsculos lipídicos, mobilização de trealose, degradação de glicano e mobilização de glicogênio estão presentes no interior dos basidiósporos de *P. microcarpus*.
3. A mobilização de trealose e degradação de glicanos podem ser de grande importância durante o evento de germinação de basidiósporos de *P. microcarpus*, já que a quantidade de transcritos referente às enzimas importantes nessas vias é encontrada em maior quantidade no interior dos basidiósporos quando comparado ao micélio vegetativo cultivado em MNM a 28 °C por 25 dias.
4. A ausência de sequências em bancos de dados relacionadas a genes expressos em basidiósporos impediu a identificação da maioria das *ESTs* obtidas, as quais possivelmente correspondem a genes ainda não identificados em outros organismos e expressos durante a basidiosporogênese.
5. A sequência de aminoácido deduzida da *EST* correspondente ao clone 277 foi similar a uma proteína responsável por proteger a célula contra os efeitos negativos causados ao metabolismo respiratório, quando há disfunção respiratória. Estudos adicionais deverão ser realizados para confirmar a presença dessa proteína nos basidiósporos de *P. microcarpus* e sua função nessa estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU, S. M.; LI, G. & ASIEGBU, F. O. Identification of *Heterobasidion annosum* (S-type) expressed during initial stages of conidiospore germination and under varying culture conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 233:205-213, 2004.
- ABRAF. Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2008. Brasília, 2009.
- ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E.; CALZAVARA-SILVA, C. E.; LIMA, C. E. P.; FIGUEIREDO, A.; SEBASTIANA, M. & PAIS, M. S. PtSRR1, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:292-295, 2009.
- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A. M.; BALDÉ, A.; MAIA, L. C. & PAIS, M. S. Fungal transcript pattern during the preinfection stage (12 h) of ectomycorrhiza formed between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* roots, identified using cDNA microarrays. *Current Microbiology*, 57:620-625, 2008.
- AGGANGAN, N. S.; MOON, H. K. & HAN, S. H. Growth response of *Acaccia mangium* Willd. seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and four isolates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. *New Forests*, 39:215-230, 2010.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K. & HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435:824-827, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Genome Research*, 25:3389-3402, 1997.

- AZUL, A. M.; SOUSA, J. P.; AGERER, R.; MARTÍN, M. P. & FREITAS, H. Land use practices and ectomycorrhizal fungal communities from oak woodlands dominated by *Quercus suber* L. considering drought scenarios. *Mycorrhiza*, 20:73-88, 2010.
- BAGO, B.; ZIPFEL, W.; WILLIAMS, R. M.; JUN, J.; ARREOLA, R.; LAMMERS, P. J.; PFEFFER, P. E. & SHACHAR-HILL, Y. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 8:108-124, 2002.
- BÉCARD, G.; KOSUTA, S.; TAMASLOUKHT, M.; SÉJALON-DELMAS, N. & ROUX, C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*, 82:1186-1197, 2004.
- BELTRAN, F. F.; CASTILLO, R.; VICENTE-SOLER, J.; CANSADO, J. & GACTO, M. Role for trehalase during germination of spores in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters*, 193:117-121, 2000.
- BESSERER, A.; PUECH-PAGES, V.; KIEFER, P.; GOMEZ-ROLDAN, V.; JAUNEUAU, A.; ROY, S.; PORTAIS, J.; ROUX, C.; BÉCARD, G. & SÉJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4:e226, 2006.
- BESSERER, A.; BÉCARD, G.; JAUNEUAU, A.; ROUX, C. & SÉJALON-DELMAS, N. GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*, 148:402-413, 2008.
- BONAWITZ, N. D.; CHATENAY-LAPOINTE, M.; WEARN, C. M. & SHADEL, G. S. Expression of the rDNA-encoded mitochondrial protein Tar1p is stringently controlled and responds differentially to mitochondrial respiratory demand and dysfunction. *Current Genetics*, 54:83-94, 2008.
- BULMER, G. S. & BENEKE, E. S. Germination of basidiospores of *Lycoperdon* species and *Scleroderma lycoperdoides*. *Mycologia*, 56:70-76, 1964.
- CAIRNEY, J. W. G. & CHAMBERS, S. M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* isolates and its host: a review of current knowledge. *Mycorrhiza*, 7:117-131, 1997.
- CAMPOS, A. N. R. & COSTA, M. D. Basidiosporogenesis, meiosis, and post-meiotic mitosis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Fungal Genetics and Biology*, 47:477-483, 2010a.
- CAMPOS, A. N. R. & COSTA, M. D. Histochemistry and storage of organic compounds during basidiosporogenesis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, DOI: 10.1007/s11274-010-0353-3, 2010b. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/6h1457016ht5x826/fulltext.pdf>> Acesso em: 11 maio 2010.
- CAMPOS, A. N. R., COSTA, M. D., TÓTOLA, M. R. & BORGES, A. C. Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1531-1540, 2008.

- CAMPOS, A. N. R. Formação de basidiósporos no fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp. 2005. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- CAMPOS, A. N. R. Caracterização das reservas de carbono e metabolismo de lipídeos em *Pisolithus*. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S.; SOUZA, A. M. & OLIVEIRA, A. F. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. *Cernea*, 3:143-160, 1997.
- CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G.; *Pisolithus*. In: CAIRNEY, J. W. G.; CHAMBERS, S.M. (Ed.) *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-31, 1999.
- COELHO, I. S., QUEIROZ, M. V.; COSTA, M. D.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F. Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. During the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. *Mycorrhiza*, DOI: 10.1007/s00572-010-0301-y, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com.w10041.dotlib.com.br/content/u7365741x868v172/fulltext.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2010.
- COELHO, P. S. R.; BRYAN, A. C.; KUMAR, A.; SHADEL, G. S.; SNYDER, M. A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes and Development*, 16:2755-2760, 2002.
- COSTA, M. D. Germinação de esporos e formação de ectomicorrizas *in vitro* por estirpes monocarióticas de *Pisolithus* sp. 2002. 153f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- DAUM, G.; WAGNER, A.; CZABANY, T. & ATHENDSTAEDT, K. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie*, 89:243-248, 2007.
- D'ENFERT, C.; BONINI, B. M.; ZAPPELLA, P. D. A.; FONTAINE, T.; DA SILVA, A. M. & TERENCEZI, H. F. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 32:471-483, 1999.
- DEVEAU, A.; KOHLER, A.; FREY-KLETT, P. & MARTIN, F. The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*, 180:379-390, 2008.
- FRIES, N. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 88:1-7, 1987.
- FRIES, N.; BARDET, M. & SERCK-HANSEN, K. Growth of ectomycorrhizal fungi stimulated by lipids from a pine root exudate. *Plant and Soil*. 86:287-290, 1985.
- GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGG, W.; MA, L.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.;

- MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGETHOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELLI, E.; BIELKE, C.; RUDD, ST.; FRISHMAN, D.; KRYSSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DESOUZA, C. P. C.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C. & BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422:859-868, 2003.
- GOMEZ-ROLDAN, V.; ROUX, C.; GIRARD, D.; BÉCARD, G. & PUECH-PAGÉS, V. Striginolactones: promising plant signals. *Plant Signal Behavior*, 2:163-164, 2007.
- GREUTER, B. & RAST, D. Ultrastructure of the dormant *Agaricus bisporus* spore. *Canadian Journal of Botany*, 53:2096-2101, 1975.
- GUPTA, A. & CHATTOO, B. B. A novel gene *MGA1* is required for appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 44:1157-1169, 2007.
- HUANG, X. & MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9:868-877, 1990.
- INOUE H.; NOJIMA H. & OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96:23-28, 1990.
- KARP, G. Expressão da informação genética: da transcrição à tradução. In: **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Tradução: CESARIO, M. D. *et al.* Manole, Barueri. p.439-493, 2005.
- KASUGA, T.; TOWNSEND, J. P.; CHAOGUANG, T.; GILBERT, L. B.; MANNHAUPT, G.; TAYLOR, J. W. & GLASS, N. L. Long-oligomer microarray profiling in *Neurospora crassa* reveals the transcriptional program underlying biochemical and physiological events of conidial germination. *Nucleic Acids Research*, 33:6469-6485, 2005.
- KIKUCHI, K.; MATSUSHITA, N.; SUZUKI, K. & HOGETSU, T. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza*, 17:563-570, 2007.
- KOPE, H. H. & FORTIN, J. A. Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arhizus*. *Mycologia*, 82:350-357, 1990.
- LACZKO, E.; BOLLER, T. & WIEMKEN, V. Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant, Cell and Environment*, 27:27-40, 2003.
- LAERE, A. V. Intermediary metabolism. In: **The growing fungus**. GROW, N. A. R. & GADD, G. M (eds). Chapman and Hall, London, p.211-238, 1995.
- LAMARRE, C.; SOKOL, S.; DEBEAUPUIS, J.; HENRY, C.; LACROIX, C.; GLASER, P.; *et al.* Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics*, 9:417, 2008.

- LAMB, R. J. & RICHARDS, B. N. Survival potential of sexual and asexual spores of ectomycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 62:181-191, 1974.
- LARIONOV, A.; KRAUSE, A. & MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, 6:62, 2005.
- LIU, T. B.; LU, J. P.; LIU, X. H.; MIN, H. & LIN, F. C. A simple and effective method for total RNA isolation of apressoria in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9:811-817, 2008.
- LUO, H.; SUN, C.; SONG, J.; LAN, J.; LI, Y.; LI, X. *et al.* Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Chinese Medicine*, 5:1-7, 2010.
- MAGGIO-HALL, L. A. & KELLER, N. P. Mitochondrial β -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 54:1173-1185, 2004.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHREN, D.; BRUN, A.; DANCHIN, E. G. J.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H. J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUEE, M.; BROKSTEIN, P.; CANBACK, B.; COHEN, D.; COURTY, P. E.; COUTINHO, P. M.; DELARUELLE, C.; DETTER, J. C.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUCIC, E.; FREY-KLETT, P.; FOURREV, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P. J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBE, J.; LIN, Y. C.; LEGUE, V.; LE TACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; NICULITA-HIRZEL, H.; OUDOT-LE SECQ, M. P.; PETER, M.; QUESNEVILLE, H.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHUMTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KUES, U.; LUCAS, S.; VAN DE PEER, Y.; PODELA, G. K.; POLLE, A.; PUKKILA, P. J.; RICHARDSON, P. M.; ROUZE, P.; SANDERS, I. R.; STAJICH, J. E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G. & GRIGORIEV, I. V. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452:88-92, 2008.
- MARTIN, F.; CANET, D.; MARCHAL, J. & BRONDEAU, J. *In vivo* natural-abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of living ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 75:151-153, 1984.
- MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria – I: antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59:153-163, 1969.
- MIMS, C. W. Ultrastructure of basidiospores of the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, 58:1525-1533, 1980.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 1152p, 2000.
- OH, Y. T.; AHN, C.; KIM, J. G.; RO, H.; LEE, H. & KIM, J. W. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47:246-253, 2010.

- OHTA, A. Effects of butyric acid and related compounds on basidiospore germination of some mycorrhizal fungi. Transactions of the Mycological Society of Japan, 29:375-381, 1988.
- PASCUAL, S.; DE CAL, A.; MAGAN, N & MELGAREJO, P. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. Journal of Applied Microbiology, 89:847-853, 2000.
- PEAY, K. G.; BRUNS, T. D. & GARBELOTTO, M. Testing the ecological stability of ectomycorrhizal symbiosis: effects of heat, ash and mycorrhizal colonization on *Pinus muricata* seedlings performance. Plant and Soil, 330:291-302, 2010.
- PEREIRA, G. M. D. Germinação "in vitro" de esporos de *Pisolithus* sp. 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- PETER, M.; COURTY, P.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D. *et al.* Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. New Phytologist, 159:117-129, 2003.
- REICH, M.; GÖBEL, C.; KOHLER, A.; BUÉE, M.; MARTIN, F.; FEUSSNER, I. & POLLE, A. Fatty acid metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. New Phytologist, 182:950-964, 2009.
- RUCH, D. G. & NORTH, M. C. Ultrastructure of dormant basidiospores of *Agaricus campestris*. Canadian Journal of Botany, 66:583-587, 1987.
- RUCH, D. G.; BURTON, K. W. & INGRAM, L. A. Occurrence of the glyoxylate cycle in the basidiospores of homobasidiomycetes. Mycologia, 83:821-825, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning. A Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344p, 2001.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74:5463-5467, 1977.
- SANTOS, M. L. Composição da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius*. 2004. 51f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- SHIMOMURA, N.; AIMI, T.; MATSUMOTO, T.; MAEKAWA, N. & OTANI, H. Ultrastructure of developing basidiospores in *Rhizopogon roseolus*. Mycoscience, 49:35-41, 2008.
- SMITH, S. E. & READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis.** 3rd ed. Academic Press, London, 800p, 2008.
- SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D. & BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos ectomicorrízicos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 10:612-618, 2006.

- STOMMEL, M.; MANN, P. & FRANKEN, P. EST-library construction using spore RNA of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycorrhizha*, 10:281-285, 2001.
- THOMAS, S. W.; RASMUSSEN, S. W.; GLARING, M. A.; ROUSTER, J. A.; CHRISTIANSEN, S. K. & OLIVER, R. P. Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. *Fungal Genetics and Biology*, 33:195-211, 2001.
- THREVELEIN, T. N.; HOLLANDER, J. A. & SHULMAN, R. G. Changes in the activity and properties of trehalase during early germination of yeast ascospores: correlations with trehalose breakdown as studied by in vivo ¹³C NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79:3503-3507, 1984.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, L. & MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal*, 25:181-191, 2001.
- WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2nd ed. Oxford University Press, New York, 565p, 2000.
- YOUCKTENG, R.; MARTHEYM S.; CHIAPELLO, H.; GENDRAULT, A.; MICHAEL E HOOD.; RODOLPHE, F.; DEVIER, B.; WINCKER, P.; DOSSAT, C. & GIRAUD, T. Expressed sequences tags of the anther smut fungus, *Microbotryum violaceum*, identify mating and pathogenicity genes. *BMC Genomics*, 8:272, DOI;101186/1471-2164-8-272, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/272>> Acesso em: 20 jun. 2010.
- ZAHIRI, A. L.; BABU, M. R. & SAVILLE, B. J. Differential gene expression during teliospore germination in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 273:394-403, 2005.
- ZUBER, S.; HYNES, M. J. & ANDRIANOPOULOS, A. The G-Protein {alpha}-subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Genetics*, 164:487-499, 2003.