

JULINE MARTA WALTER

ECTOMICORRIZA *IN VITRO* ENTRE *Hydnangium* sp. E *Eucalyptus grandis* E ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DE GENES DE *Hydnangium* sp.

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

JULINE MARTA WALTER

ECTOMICORRIZA *IN VITRO* ENTRE *Hydnangium* sp. E *Eucalyptus grandis* E ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DE GENES DE *Hydnangium* sp.

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

APROVADA: 16 de março de 2009

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)

Prof^o Marcos Rogério Tótola

Prof^a Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

*Dedico aos meus pais, por todo carinho
e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Estes dois anos vividos na UFV vão estar guardados na minha memória para toda a vida. Foram muitos momentos de dificuldade, tensão e pressão, mas também muitos momentos de alegrias e descontrações com os verdadeiros amigos que tive a oportunidade de construir em Viçosa.

Agradeço a todos que compartilharam momentos comigo e que de uma forma ou outra me auxiliaram na realização deste trabalho:

Primeiramente, devo agradecer à minha família que, mesmo tão longe, não deixou de me incentivar e me apoiar em todas as decisões tomadas em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade que me deu de fazer parte de um programa de pós-graduação tão bem conceituado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) pelo suporte dado e pela excelente formação oferecida.

À professora Elza, pela orientação, disposição e demonstração de competência e garra.

À professora Maria Catarina, pela motivação, acompanhamento e pelas agradáveis conversas.

À professora Marisa, pelas sugestões e ensinamentos.

Ao professor Maurício pelas sugestões e conversas agradáveis.

À professora Denise, pelo apoio, sugestões e carisma.

À professora Célia, pela excelente coordenação e dedicação ao PPGMA.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos valiosos para minha formação profissional.

À Nilcéa, pelo auxílio prestado a todos os alunos do PPGMA.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética pelos momentos agradáveis que tivemos, seja nos trabalhos diários de laboratório ou nas festinhas e churrascos: Ana

Paula, Andréia, Daniel, Fábio, Guilherme, Irene, Janaína, Leandro, Leonardo, Mateus, Mariana, Mariane, Maycon, Swiany, Rafael, Rodrigo, Tatiana.

Aos amigos que assessoram de forma única o Laboratório de Genética: Jaqueline e Rafael.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios e Alimentos: Alexandra, Ana Andréia, Emilene, Fernanda, Gardênia, Janaína e Natan.

Aos amigos do Laboratório de Micorrizas: José Maria, Laélia, Marliane, Marlon, Mateus e Victor.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial: Ana Paula, Alessandra, Eliane, José Carlos, Margarete, Thiago e Vanessa.

Aos amigos do Laboratório de Petróleo: Aline, Bruna, Patrícia e Péricles.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Talita, Yaro e Júlio.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana: Isabella, Marcelo, Maurício e Raul.

Aos amigos da Microvet: Mayka e Klédna.

Aos técnicos do Bioagro, pela grande ajuda que oferecem aos alunos: Danilo, Evandro e Toninho.

Vocês foram especiais na condução do meu mestrado e estarão carinhosamente guardados na minha memória. Obrigada a todos!

Em especial aos meus grandes e eternos amigos Alexandra, Aline, Ana Paula e Guilherme! Agradeço vocês pela amizade verdadeira! Vocês foram os grandes alicerces nas horas de dificuldade e os companheiros nos momentos de alegria. “Foi ótimo!!!”

BIOGRAFIA

JULINE MARTA WALTER, filha de Kurt Alberto Walter e Dirce Marta Walter, nasceu em Ijuí, no Rio Grande do Sul, dia 22 de outubro de 1985.

Em março de 2003 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS. Graduiu-se como bacharel em Ciências Biológicas em fevereiro de 2007, pela mesma universidade.

Em março de 2007 iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema demonstrando os passos experimentais. As amostras dos controles (culturas puras de <i>E. grandis</i> e de <i>Hydnangium</i> sp.) e as fases de cinco, 10 e 20 dias após a inoculação com o fungo, para a formação de ectomicorriza, foram coletadas.....	23
Figura 2	Micorrização <i>in vitro</i> . Plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> após 20 dias de inoculação com o fungo <i>Hydnangium</i> sp. Em destaque observam-se as ectomicorrizas formadas ao longo da raiz de <i>E. grandis</i> após 20 dias de inoculação.....	28
Figura 3	Raiz de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada parcialmente (a) e apresentando uma vasta colonização (b). A seta mostra uma ramificação da raiz, mais espessa e coberta por micélio, após 20 dias de inoculação com <i>Hydnangium</i> sp.....	29
Figura 4	Fases da micorrização <i>in vitro</i> entre <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Hydnangium</i> sp. Placas contendo as plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i> após cinco (d), 10 (g) e 20 dias (j) de inoculação com o micélio de <i>Hydnangium</i> sp., e a placa controle (a); observação sob lupa de raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas após cinco (e), 10 (h) e 20 dias (k), e o controle (b); cortes transversais em microscopia óptica de raízes de <i>Eucalyptus grandis</i> inoculadas em cinco (f), 10 (i) e 20 dias (l), e o controle (c). As escalas estão apresentadas para cada uma das figuras. Para a visualização das estruturas fúngicas, as amostras foram coradas com o corante básico azul de toluidina 0,05 %.....	30-31
Figura 5	Corte transversal de raiz de <i>E. grandis</i> ectomicorrizada por <i>Hydnangium</i> sp. (a) e, em detalhe, mostrando o manto e a rede de Hartig (b). M = manto; RH = rede de Hartig.....	32
Figura 6	Amplificação dos genes <i>atp</i> e <i>aat</i> de <i>Hydnangium</i> sp. O fragmento a foi obtido por meio da amplificação utilizando os oligonucleotídeos D10GENL3/D10GENR3 e o fragmento b foi obtido por meio da amplificação utilizando os oligonucleotídeos H01GENL2/H01GENR2. O peso molecular dos fragmentos do marcador PhiX174/ <i>Hae</i> III estão mostrados em pares de bases.....	36
Figura 7	Alinhamento das seqüências de cDNA e DNA genômico de <i>Hydnangium</i> sp. e de <i>Laccaria bicolor</i> para o gene que codifica ATP sintase. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados estão sublinhadas. As direções das amplificações estão mostradas. As caixas em destaque correspondem às regiões de localização dos íntrons encontrados em <i>Laccaria bicolor</i> e preditos em <i>Hydnangium</i> sp. por meio do alinhamento das seqüências de cDNA de <i>Hydnangium</i> sp. e cDNA e DNA	

	genômico de <i>Laccaria bicolor</i> . As regiões em realce representam as seqüências dos íntrons de <i>Hydnangium</i> sp. para a seqüência parcial do gene que codifica ATP sintase.....	38-39
Figura 8	Alinhamento das seqüências de cDNA e DNA genômico de <i>Hydnangium</i> sp. e de <i>Laccaria bicolor</i> para o gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados estão sublinhadas. As direções das amplificações estão mostradas. As caixas em destaque correspondem às regiões de localização dos íntrons encontrados em <i>Laccaria bicolor</i> e preditos em <i>Hydnangium</i> sp. por meio do alinhamento das seqüências de cDNA de <i>Hydnangium</i> sp. e cDNA e DNA genômico de <i>Laccaria bicolor</i> . As regiões em realce representam as seqüências dos íntrons de <i>Hydnangium</i> sp. para a seqüência parcial do gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase.....	41-42
Figura 9	Posição dos íntrons identificados em <i>Hydnangium</i> sp. e em <i>Laccaria bicolor</i> para os genes <i>atp</i> e <i>aat</i> . As barras verticais correspondem aos íntrons, com o tamanho em pares de bases representado acima de cada íntron. A posição +1 correspondente ao códon de início da tradução ATG e o códon de terminação TAA estão representados nas seqüências completas dos genes <i>atp</i> e <i>aat</i> de <i>Laccaria bicolor</i>	46
Figura 10	Análise filogenética da seqüência deduzida da proteína ATP sintase. A árvore foi baseada na comparação de seqüências de polipeptídeos do gene <i>atp</i> de <i>Hydnangium</i> sp. com outras espécies. A construção foi baseada no método de <i>Neighbor-joining</i> utilizando o modelo de substituição distância p. Os valores de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo, em cada uma das árvores construídas. A distância dos ramos está indicada na parte inferior.....	47-48
Figura 11	Análise filogenética da seqüência deduzida da proteína acetil-CoA acetiltransferase. A árvore consenso foi baseada na comparação de seqüências de polipeptídeos do gene <i>aat</i> de <i>Hydnangium</i> sp. com outras espécies. A construção foi baseada no método de <i>Neighbor-joining</i> utilizando o modelo de substituição distância p. Os valores de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo, em cada uma das árvores construídas. A distância dos ramos está indicada na parte inferior.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de seqüências genômicas de <i>Hydnangium</i> sp.....	25
Tabela 2	Organismos utilizados nas análises filogenéticas das seqüências de aminoácidos do gene que codifica ATP sintase.....	26
Tabela 3	Organismos utilizados nas análises filogenéticas das seqüências de aminoácidos do gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase.	27
Tabela 4	Número e posição de íntrons em genes de diferentes espécies de fungos.....	43-44

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1. Associações micorrízicas.....	3
2. O fungo ectomicorrízico <i>Hydnangium</i> sp.....	9
3. O gênero <i>Eucalyptus</i>	10
4. Mecanismo molecular da formação ectomicorrízica.....	11
5. Análises das seqüências e caracterização de organização gênica em fungos.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1. Crescimento e manutenção do fungo <i>Hydnangium</i> sp.....	20
2. Desinfestação das sementes e produção de plântulas de <i>Eucalyptus grandis</i>	20
3. Estabelecimento da associação ectomicorrízica entre <i>Hydnangium</i> sp. e <i>Eucalyptus grandis</i> utilizando a micorrização <i>in vitro</i>	21
4. Avaliação e monitoramento das fases de formação da ectomicorriza..	22
5. Extração de RNA total.....	23
6. Extração de DNA total.....	24
7. Amplificação e caracterização dos íntrons das seqüências parciais dos genes <i>atp</i> e <i>aat</i> em <i>Hydnangium</i> sp.....	24
8. Análise filogenética dos genes <i>atp</i> e <i>aat</i>	25

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
1. Formação de ectomicorriza por meio de síntese <i>in vitro</i> e avaliação morfológica das raízes nas diferentes fases de formação da ectomicorriza.....	28
2. Caracterização de íntrons nas seqüências parciais dos genes <i>atp</i> e <i>aat</i> em <i>Hydnangium</i> sp.....	35
3. Análise filogenética dos genes que codificam ATP sintase e acetil-CoA acetiltransferase.....	46
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

WALTER, Juline Marta. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009.
Ectomicorriza *in vitro* entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* e análises de seqüências de genes de *Hydnangium* sp. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-Orientadores: Marisa Vieira de Queiroz, Maria Catarina Megumi Kasuya e Maurício Dutra Costa.

Hydnangium sp. é um fungo basidiomiceto capaz de formar ectomicorriza com espécies de *Eucalyptus*. Os sistemas de micorrização *in vitro* vêm sendo largamente utilizados para estudar interações micorrízicas, tornando-se um sistema simples e reproduzível para as análises de expressão de genes envolvidos na interação. Neste trabalho, a técnica de micorrização *in vitro* para a interação do fungo *Hydnangium* sp. com *E. grandis* foi realizada para as fases de colonização, diferenciação e funcionamento da ectomicorriza. A fase de colonização foi verificada após cinco dias de inoculação com *Hydnangium* sp., a fase de diferenciação após 10 dias e a fase de funcionamento após 20 dias de inoculação. A morfologia externa foi analisada por lupa e foram avaliados cortes microscópicos para a detecção do manto e da rede de Hartig. A extração de RNA total foi realizada para cada uma das fases, com o objetivo de analisar a expressão gênica. Entretanto, a quantidade de material proveniente de raízes de 130 plântulas para cada fase, foi insuficiente para a detecção de transcritos por meio de RT-PCR. A análise dos íntrons das seqüências parciais dos genes que codificam ATP sintase (*atp*) e acetil-CoA acetiltransferase (*aat*) de *Hydnangium* sp. permitiu a identificação de dois íntrons na seqüência parcial do gene *atp* (53 e 65 pb), enquanto que na seqüência parcial do gene *aat* foram identificados três íntrons (52, 52 e 46 pb). Todos os íntrons analisados possuem a seqüência padrão 5' GT – 3' AG no sítio de processamento, variando os nucleotídeos adjacentes. A análise filogenética, utilizando as seqüências parciais de aminoácidos deduzidas dos genes *atp* e *aat*, permitiu a separação correta dos grupos, corroborando a classificação do fungo *Hydnangium* sp. como pertencente à mesma família de *Laccaria bicolor*.

ABSTRACT

WALTER, Juline Marta. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009.
Ectomycorrhiza *in vitro* between *Hydnangium* sp. and *Eucalyptus grandis* and sequences analysis of *Hydnangium* sp. Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-Advisers: Marisa Vieira de Queiroz, Maria Catarina Megumi Kasuya and Maurício Dutra Costa.

Hydnangium sp. is a basidiomycetous fungus that is capable of forming ectomycorrhiza with *Eucalyptus* species. The *in vitro* mycorrhization system is widely used for mycorrhizal interactions studies, becoming a simple and reproducible system for the symbiosis-regulated genes expression analysis. In this work, the *in vitro* mycorrhization system for the *Hydnangium* sp. and *Eucalyptus grandis* interaction was performed for the colonization, differentiation and functioning phases for the ectomycorrhiza formation. The colonization phase were verified after five days of inoculation with the *Hydnangium* sp., the differentiation phase after ten days and the functioning phase after 20 days of inoculation. The extern morphology was analyzed by stereomicroscopy and the section microscopy was performed for the mantle and Hartig net detection. The total RNA extraction was performed for each phase, with the objective of to analyze genes expression. However, the material quantity from roots of 130 seedlings for each phase was insufficient for the transcripts detection through RT-PCR. The intron analysis of the partial sequences of the genes that encode ATP sintase (*atp*) and acetyl-CoA acetyltransferase (*aat*) of *Hydnangium* sp. enabled two introns identification in partial sequence of *atp* gene (53 and 65 bp), while in partial sequence of *aat* gene were identified three introns (52, 52 e 46 bp). All introns analyzed have the canonical sequence 5' GT – 3' AG on splicing sites, ranging the adjacent nucleotides. The phylogenetic analysis, using the partial sequences of amino acids of *atp* and *aat* genes, enabled the correct group separation, corroborating the *Hydnangium* sp. classification as belonging the same family of *Laccaria bicolor*.

INTRODUÇÃO

A associação micorrízica é consequência de uma interação mutualista entre certos fungos do solo e raízes de plantas, formando uma estrutura diferenciada, responsável pelas trocas nutricionais e outros benefícios agregados. Nesta associação universal nos ecossistemas terrestres, o fungo recebe os fotossintetizados (carbono na forma de carboidratos) para sua sobrevivência e multiplicação; e a planta tem seu status nutricional melhorado, pois é suplementada com nutrientes minerais (fósforo, nitrogênio e outros) e água, apresentando melhor crescimento em solos pobres em nutrientes. Além disso, a planta micorrizada apresenta maior tolerância às condições ambientais adversas, como extremos de temperatura, acidez e umidade, a elementos tóxicos presentes no solo, além de terem as raízes protegidas contra ataques de patógenos.

Dentre os vários grupos de micorrizas, as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas são as mais importantes sob os pontos de vistas ecológico e econômico. As ectomicorrizas apresentam uma importância ainda maior no que diz respeito à silvicultura intensiva, pois são predominantes nas essências florestais mais utilizadas para a produção de madeira, carvão e celulose, como o *Eucalyptus* spp. e o *Pinus* spp. Embora ocorram em apenas cerca de 3% dos vegetais superiores, as ectomicorrizas envolvem uma grande variedade de espécies fúngicas. No Brasil existem vários fungos que mantêm associação com diferentes espécies de *Eucalyptus*, como o fungo basidiomiceto *Hydnangium* sp., que foi relatado pela primeira vez em Minas Gerais, em associação específica com *Eucalyptus grandis* (Campos, 2004).

Estudos da formação ectomicorrízica a campo e em laboratório têm auxiliado no entendimento do processo. A passagem por cada fase é altamente regulada, envolvendo interações moleculares que resultam em modificações morfológicas e fisiológicas em ambos os organismos. Identificar os fatores que regulam a atividade metabólica e o desenvolvimento simbiótico é de especial interesse para ampliar o entendimento da

importância das ectomicorrizas na fisiologia e no desenvolvimento da planta, assim como o seu significado ecológico. A fisiologia de associações ectomicorrízicas formadas com espécies de *Eucalyptus* é bem documentada na literatura, porém, muito pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos nessas interações mutualistas. A montagem *in vitro* entre diferentes espécies capazes de estabelecer a associação ectomicorrízica é fundamental para as análises de expressão de genes nessas fases durante a formação da ectomicorriza. Recentemente, genes das fases de pré-associação e de estabelecimento micorrízico têm sido caracterizados, gerando importantes dados para o entendimento da regulação de genes nesses fungos e contribuindo para a utilização desses em programas de melhoramento.

O presente trabalho teve como objetivos montar um sistema *in vitro* da associação entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis* para as fases de estabelecimento da ectomicorriza, analisar as seqüências parciais dos genes que codificam ATP sintase (*atp*) e acetil-CoA acetiltransferase (*aat*) quanto ao número e a posição de íntrons para contribuir no entendimento da organização de genes em fungos ectomicorrízicos e analisar filogeneticamente as seqüências de aminoácidos dos genes *atp* e *aat* com as seqüências correspondentes de outros organismos, a fim de auxiliar na classificação taxonômica do fungo ectomicorrízicos *Hydnangium* sp.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Associações micorrízicas

O termo ‘micorriza’ (do grego *mykes* = fungo e *rhiza* = raiz) foi proposto pela primeira vez pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885, para designar a íntima associação entre fungos micorrízicos biotróficos do solo e raízes de plantas, onde tais associações não constituíam casos de parasitismo entre o fungo e a planta, mas que resultavam em benefícios para ambos os organismos envolvidos. Posteriormente, muitas associações micorrízicas foram identificadas na natureza e a importância dessa associação para a sobrevivência das plantas nos diversos ecossistemas foi confirmado ser crucial.

As micorrizas são associações simbióticas entre alguns fungos filamentosos do solo e raízes de plantas, que atuam como uma unidade adaptada resultando em novas vias bioquímicas funcionais na estrutura micorrízica formada. Essas associações são abundantes e amplamente distribuídas, com função essencial na manutenção dos diversos ecossistemas (Smith & Read, 1997; Read & Perez-Moreno, 2003; Johnson & Gehring, 2007). Nos ecossistemas terrestres, essa simbiose é universal, onde se estima que aproximadamente 90 % das plantas terrestres formam associações com fungos micorrízicos (Smith & Read, 1997; Selosse & Tacon, 1998; Selosse et al., 2004; Martin et al., 2007). Brundrett (2002) relata que a proporção de espécies de angiospermas conhecidas que formam micorrizas fica em torno de 82 %. Em uma perspectiva evolutiva, os fungos simbióticos micorrízicos surgiram como uma mudança de estratégia de vida a partir de um ancestral saprofítico, e provavelmente foram

fundamentais para a efetiva colonização das plantas no ambiente terrestre (Pirozynski, 1981; Hibbett et al., 1997; Hibbett et al., 2000).

As micorrizas constituem importante fator de desenvolvimento das plantas, como ficou demonstrado nas primeiras tentativas de implantação de espécies vegetais fora de seus *habitats* naturais, e na dificuldade do estabelecimento de povoamentos florestais em regiões de solos degradados, onde fungos compatíveis para estabelecer interação com as espécies introduzidas no local estavam ausentes (Vozzo & Hacksaylo, 1971).

A formação de micorrizas pode ser justificada especialmente pela vantagem nutricional que a planta e o fungo obtêm. Contudo, apesar da questão nutricional ser um fator chave na simbiose, um fluxo bilateral de nutrientes não é exclusivamente requerido e alguns efeitos de proteção entre os simbiontes melhora a sobrevivência e reprodução, e é suficiente para o estabelecimento de uma relação simbiótica (Smith & Read, 1997; Martin et al., 2001; Martin et al., 2008). Dessa forma, a simbiose pode ser definida como um recíproco melhoramento de desenvolvimento, não necessariamente apenas de obtenção e troca de nutrientes.

As micorrizas promovem benefícios para ambos os organismos envolvidos. A planta recebe água e nutrientes minerais absorvidos pelas hifas fúngicas que se estendem no solo. Essa distribuição difusa do micélio proporciona um aumento da superfície de contato das raízes com o solo, possibilitando uma maior absorção de nutrientes, principalmente de nitrogênio, fósforo e potássio. Este fenômeno é particularmente importante em relação ao fósforo, visto que a maior parte desse mineral encontra-se sob formas indisponíveis aos vegetais. Além disso, o fósforo é pouco móvel no solo, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao crescimento das plantas (Raij et al., 1982; Smith & Read, 1997). Muitas vezes, a não disponibilidade desses minerais a planta se deve a ligação com outros minerais no solo. Os fungos associados possibilitam a absorção destes, pois são capazes de secretar ácidos orgânicos (ânions orgânicos de baixa massa molecular como oxalato) e enzimas (como fosfatases) que atuam solubilizando os minerais (Lapeyrie et al., 1991). Raízes de plantas e a microflora associada também produzem ácidos orgânicos e fosfatases, entretanto em menor quantidade que os fungos micorrízicos. Dessa forma, a capacidade de alguns fungos ectomicorrízicos produzirem grandes quantidades de ácido oxálico e fosfatases, garante

uma maior captura de fósforo inorgânico do solo. Significante atividade de fosfatase, que mineraliza a matéria orgânica por hidrólise, tem sido documentada em fungos micorrízicos crescendo em culturas puras e em ectomicorizas.

Estudos demonstram que a associação com fungos micorrízicos garante também maior resistência a patógenos radiculares (Cordier et al., 1998), maior resistência a condições extremas de temperatura, acidez, umidade e seca (Marx, 1972; Allen, 1991; Nilsen et al., 1998; Augé, 2001; Shi et al., 2002), além de maior tolerância a estresse por metais pesados presentes no solo (Kothari et al., 1991; Colpaert & van Assche, 1993; Van Tichelen et al., 1999; Gonçalves et al., 2008). De acordo com Lanfranco et al. (2002), a proteção contra metais pesados, garantida pela interação de certas plantas com fungos ectomicorrízicos, sugere esses fungos como potenciais para a aplicação nos processos de biorremediação.

Isso vem sendo demonstrado em vários trabalhos em que a associação com fungos ectomicorrízicos garante às plantas maior resistência e sobrevivência em áreas contaminadas com poluentes típicos do solo, como os metais Cd, Pb, Cu e Mn e outros compostos tóxicos (Lanfranco et al., 2002; Gonçalves et al., 2008). Uma variedade de fungos ectomicorrízicos tem demonstrado a capacidade de degradar cinco das principais classes dos chamados poluentes orgânicos persistentes, promovendo proteção de diversas maneiras. Essa maior tolerância pode ser devido ao fato de que o metal liga-se aos componentes da parede celular fúngica, como quitina, celulose, derivados de celulose e melaninas, levando a eliminação do metal (Jentschke & Godbold, 2000), ou por estimulação da tolerância inerente da planta em resposta ao maior suprimento de nutrientes ou, ainda, por ativação de vias de defesa incluindo poliaminas e glutathione (Galli et al., 1994; Zarb & Walters, 1995; Schützendübel & Polle, 2002). Outros autores sugerem que os ácidos orgânicos exsudados pelas ectomicorizas também agem como agentes quelantes de metais e destoxificadores, além de apresentarem função na aquisição de nutrientes (Jones, 1998; Ray & Adholeya, 2008). O aumento da tolerância a metais pesados foi verificado em solos contaminados por ação antrópica e também em solos naturalmente metalíferos (Colpaert & van Assche, 1993; Gonçalves et al., 2008; Ray & Adholeya, 2008).

Os fungos associados às raízes, por sua vez, recebem compostos sintetizados pela planta, como aminoácidos, vitaminas e carboidratos do processo de fotossíntese da

planta, em um fluxo que beneficia o crescimento das hifas e de estruturas reprodutivas, possibilitando o fungo completar o seu ciclo de vida (Smith & Read, 1997; Selosse et al., 2004). Estima-se que o fungo ectomicorrízico associado receba entre 20 a 25 % dos produtos fotossintéticos da planta (Finlay & Söderström, 1992; Högborg & Högborg, 2002; Hobbie, 2006). Outros autores sugerem que esse valor é acima de 30 % (Wiemken, 2007).

Recentemente, trabalhos envolvendo o balanço nutricional na micorriza apresentaram novas descobertas e ratificaram as já existentes, demonstrando que no tecido ectomicorrízico há um forte fluxo de hexoses que é influenciado pelo fungo (Nehls et al., 2001a; Nehls et al., 2001b). No entanto, a planta precisa controlar esse fluxo de hexoses para o fungo a fim de evitar o parasitismo (Nehls et al., 2000; Nehls et al., 2001a; Nehls et al., 2001b; Nehls, 2008; López et al., 2008). Estudos anteriores, marcando os assimilados fotossintéticos com ^{14}C , já haviam mostrado uma rápida translocação das hexoses das raízes para o fungo (Melin & Nilsson, 1952; Haklev & Lewis, 1969; Smith et al., 1969). Uma das causas desse direcionamento seria a preferência do fungo em assimilar carboidratos simples das raízes da planta (López et al., 2007).

Sete tipos de associações micorrízicas são conhecidos; porém, algumas apresentam estágios de desenvolvimento muito similares (Brundrett, 2002; Smith et al., 2003). Dentre os vários tipos de micorrizas, os mais comumente encontrados são as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas, as quais apresentam uma enorme importância ecológica e econômica. As demais são restritas a famílias específicas de plantas.

As micorrizas arbusculares (AMs) são as mais comumente encontradas em florestas tropicais e as mais diversificadas (associando-se com raízes de 80 % das plantas vasculares). Esse tipo de associação não é muito específica, visto que são cerca de 200 espécies de fungos envolvidos na formação desse tipo de micorriza (Smith & Read, 1997; Amaranthus, 1998). Todos os fungos capazes de formar AMs são classificados como pertencentes à ordem Glomerales (Morton, 1988). As micorrizas arbusculares não promovem a modificação da aparência externa da raiz. Porém, as hifas do fungo penetram nas células corticais da raiz da planta e, intracelularmente, os terminais das hifas sofrem diferenciação em estruturas efêmeras, semelhantes a

haustórios, chamadas de arbúsculos e alguns podem apresentar estruturas (vesículas) que contêm lipídeos e proteínas (Smith & Read, 1997; Amaranthus, 1998).

Os fungos capazes de estabelecer associações ectomicorrízicas (ECMs) pertencem principalmente ao Filo Basidiomycota, havendo também representantes do Filo Ascomycota e algumas poucas espécies do Filo Zigomycota (Smith & Read, 1997). As ectomicorrizas são mais freqüentemente encontradas nas florestas temperadas, mais homogêneas (Pyrozynsky, 1980). Os fungos ECMs colonizam as raízes modificando sua coloração e sua forma. São caracterizados por apresentarem um extensivo desenvolvimento de hifas, as quais se diferenciam em estruturas que possuem funções próprias no tecido ectomicorrízico.

A rede de Hartig é formada pelo crescimento das hifas nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex da raiz, e atua como uma interface entre a planta e o fungo, realizando a troca de carboidratos derivados da planta pelos nutrientes derivados do fungo. As hifas que crescem recobrimdo as células da epiderme radicular e envolvendo todo o diâmetro das raízes formam uma camada chamada de manto. O manto pode variar amplamente em espessura, cor e textura dependendo de quais espécies formam a associação em questão. O manto aumenta a área de superfície de absorção da raiz, em uma proporção de 1000 vezes, em comparação com as raízes não micorrizadas e, freqüentemente, afeta a morfologia da raiz, resultando em bifurcação e agrupamento (Harley & Smith, 1983). Além disso, o manto é responsável por intermediar o armazenamento de nutrientes entre o micélio crescendo no solo e as hifas da rede de Hartig.

Contínuo com o manto estão as hifas que se estendem para o solo e que interligam as ectomicorrizas aos basidiocarpos (Smith & Read, 1997; Amaranthus, 1998; López et al., 2007). Essas hifas do fungo ECM que se estendem além da rizosfera usual da raiz podem crescer vários metros, explorando assim, substancial distância de solo a partir das raízes, enquanto que as hifas do fungo AM podem se espalhar por apenas cerca de 250 mm. Além disso, as hifas podem ligar as raízes de mais de uma planta e formar uma extensiva rede, possibilitando a transferência de carbono e nutrientes de uma planta para a outra, ou entre as hifas de fungos colonizando diferentes plantas (Smith et al., 2003). Simard et al. (1997) usaram carbono marcado (C^{13} e C^{14})

para demonstrar a transferência do carbono de 3 a 10 % entre plantas de *Betula papyrifera*, capazes de estabelecer ECM.

Estimativas quanto ao número de espécies de fungos capazes de estabelecer associações ectomicorrízicas são bastante variáveis e ainda subestimadas, porém, recentes explorações em florestas tropicais e de eucaliptos revelaram novas espécies de fungos ectomicorrízicos. Molina et al. (1992) sugerem que há cerca de 5.500 espécies de fungos ectomicorrízicos. Contudo, outros pesquisadores acreditam que o tamanho da comunidade de fungos ectomicorrízicos seja em torno de 7.000 a 10.000 espécies (Taylor & Alexander, 2005). Entretanto, se formos considerar que apenas 5% da diversidade fúngica do planeta é conhecida, ou seja, cerca de 80.000 espécies descritas (Kirk et al., 2001), de um total estimado de 1,5 milhão de espécies (Hawksworth, 1997), pode-se supor que o número de espécies de fungos ectomicorrízicos seja ainda maior.

Em comparação com a grande diversidade de plantas que formam micorriza arbuscular, o número de espécies vegetais que estabelecem associação ectomicorrízica é relativamente pequeno: cerca de 8.000 espécies, e aproximadamente 3 % das plantas fanerógamas (Meyer, 1973; Hibbett et al., 2000; Le Quéré et al., 2005). Embora as associações ectomicorrízicas ocorram em uma minoria de espécies vegetais (3 % dos vegetais superiores), elas envolvem uma grande variedade de espécies fúngicas e, além disso, são predominantes nas essências florestais mais utilizadas em silvicultura no mundo. No que tange à silvicultura intensiva mundial, espécies das famílias Pinaceae, Myrtaceae e Fagaceae lideram o número de área plantada. Dois exemplos de grande importância econômica nacional são *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., que ocupam extensas áreas de reflorestamento e servem de matéria-prima para a indústria de celulose, carvão e madeira (Wilcox, 1990; Alexopoulos et al., 1996; Smith & Read, 1997; Costa et al., 2003; Taylor & Alexander, 2005). A associação ectomicorrízica estudada nesse trabalho compreende *Eucalyptus grandis* e *Hydnangium* sp., descritos nos tópicos seguintes.

2. O fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp.

O fungo *Hydnangium* sp. é um basidiomiceto pertencente à família Hydnangiaceae, que apresenta especificidade a diversas espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, formando ectomicorrizas típicas (Beaton et al., 1984; Moore et al., 1989). Apresenta basidiocarpo avermelhado que pode ser hipógeo ou sub-epígeo. As hifas são septadas de coloração hialina e as ectomicorrizas formadas possuem coloração creme, porém as mais velhas apresentam coloração marrom no ápice, com ramificação simples ou raramente bifurcada nas laterais (Campos, 2004).

Existem mais de 70 espécies e subespécies do gênero *Hydnangium*, localizadas em regiões da Nova Zelândia, Austrália, Portugal, Espanha e nos Estados Unidos (Malajczuk et al., 1982; Claridge et al., 1999; Zipcodezoo, 2009; Index Fungorum, 2009). No Brasil, esse gênero foi primeiramente identificado no estado de Minas Gerais, formando associação ectomicorrízica com *Eucalyptus grandis* (Campos, 2004). Entretanto, na literatura consta o relato de associações de *Hydnangium* com diversas outras espécies de eucaliptos, tais como *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus marginata*, *Eucalyptus maculata* (Malajczuk et al., 1982), *Eucalyptus pilularis* (Moore et al., 1989), *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus diversicolor* (Bougher et al., 1993). Dentre as principais espécies de eucaliptos plantadas para fins comerciais, principalmente para celulose e madeira, *E. globulus*, *E. camaudulensis* e *E. grandis* são capazes de estabelecer associações ectomicorrízicas com *Hydnangium* (Eldridge et al., 1993).

O gênero *Hydnangium* forma um clado monofilético com o gênero *Laccaria*, representantes da família Hydnangiaceae (Mueller & Ammirati, 1993; Mueller & Hosaka, 2006). Essa grande proximidade filogenética é de especial interesse, visto que o genoma de *Laccaria bicolor* foi recentemente seqüenciado (Martin et al., 2008), representando um modelo entre os fungos ectomicorrízicos. O banco de dados do genoma de *L. bicolor* será um suporte conveniente para os estudos de genômica funcional para a compreensão da interação simbiótica com plantas. Entre os fungos ectomicorrízicos beneficiados está *Hydnangium* sp. Além disso, outra vantagem de se trabalhar com *Hydnangium* sp. é seu rápido crescimento *in vitro*, diferentemente de *Laccaria* spp., que apresentam crescimento vegetativo lento *in vitro*.

3. O gênero *Eucalyptus*

Assim como algumas outras espécies vegetais, as do gênero *Eucalyptus* conseguem estabelecer os dois tipos principais de micorrizas, a ectomicorriza e a arbuscular. Pertencentes à família Myrtaceae, *Eucalyptus* engloba mais de 800 espécies arbóreas, incluindo variedades e híbridos naturais da Austrália e ilhas próximas (Coppen, 2002). Contudo, encontram-se amplamente distribuídas pelo mundo, devido a sua própria rusticidade, além de serem consideradas elementos florestais chave para a produção de madeira, bem como para a produção de polpa e papel no mundo inteiro e, em menor escala, na extração de óleos essenciais (Doughty, 2000; Brooker, 2000; Potts, 2004).

No Brasil, o eucalipto foi introduzido no início do século XX para suprir a demanda de madeira do país (Lima, 1993; Lupatini et al., 2008). Atualmente, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de pasta de celulose e papel, com um total de área mundial plantada com eucalipto atingindo aproximadamente 40 %, o que corresponde a cerca de 6 milhões de hectares plantados (Neilson, 2000; FAO, 2004). Além disso, é a planta mais extensivamente empregada em programas nacionais de reflorestamento homotípico (Lupatini et al., 2008).

Inúmeras características fazem do eucalipto a planta ideal para a produção em larga escala de madeira e papel, como o rápido crescimento em associação com fungos ectomicorrízicos do solo, alta produção de celulose e considerável variação genética garantindo uma ampla adaptabilidade a variados climas e solos (Eldridge et al., 1993; Doughty, 2000). Além disso, altas temperaturas aliada a abundância de água, melhoram o estabelecimento e o crescimento dessas plantas, gerando curtos ciclos de rotações da cultura (Lima, 1993), e assim, favorecendo seu uso nas regiões tropicais.

Dentre as centenas de espécies e híbridos existentes, as principais espécies plantadas para fins comerciais são *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. camaudulensis*, *E. saligna* e *E. terenticornis* (Eldridge et al., 1993). *Eucalyptus grandis* é uma das espécies de maior importância comercial, utilizada como base em vários programas de melhoramento genético em muitos países, principalmente por suas características de rápido crescimento e alta densidade da madeira (Neilson, 2000; FAO, 2004).

Entretanto, apesar de ser uma das mais produtivas atividades do país, o Brasil encontra fatores limitantes no que diz respeito à fertilidade do solo. A maioria dos solos utilizados para plantios florestais é de baixa fertilidade (Raij, 1991), o que torna ainda maior a importância dos fungos ectomicorrízicos e seus estudos à campo e em laboratório, abordando a ecologia e seus mecanismos fisiológicos e moleculares.

4. Mecanismos moleculares da formação ectomicorrízica

Numerosos trabalhos têm utilizado os métodos de micorrização *in vitro* para identificar genes expressos no fungo e na planta durante o desenvolvimento da ectomicorriza, por meio da análise de biblioteca subtrativa de cDNA e por microarranjos (Podila et al., 2002; Peter et al., 2003; Menotta et al., 2004; Krüger et al., 2004; Zaretsky et al., 2006; Heller et al., 2008). Por conseguinte, esses modelos vêm permitindo a elucidação molecular e fisiológica do funcionamento de mecanismos envolvidos na micorrização, como por exemplo, a troca de nutrientes (Nehls et al., 1998; Nehls et al., 2000; Deveau et al., 2008).

O desenvolvimento de uma ectomicorriza funcional requer uma série complexa de interações entre o fungo e a planta, interações estas que começam antes mesmo da formação de uma interface simbiótica (Martin et al., 1995; Menotta et al., 2004; Frettinger et al., 2007). As mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem são consequência de um processo altamente regulado envolvendo reorganização molecular e alteração da expressão de genes em resposta a sinais ambientais e de desenvolvimento (Martin et al., 2001; Duplessis et al., 2005; Le Quéré et al., 2005; Frettinger et al., 2007; Martin, 2008).

Para o desenvolvimento e manutenção da micorriza funcional, mudanças na expressão dos genes que controlam a sinalização de diversas vias metabólicas devem ocorrer em cada etapa do desenvolvimento (Zaretsky et al., 2006). Didaticamente, foram estabelecidas quatro diferentes etapas: pré-simbiótica (pré-interação), iniciação (colonização), diferenciação e funcionamento (Martin & Botton, 1993; Martin et al., 1997; Martin & Tagu, 1999).

Diferentes sistemas modelo de simbiose têm sido utilizados para estudar as modificações durante as fases de formação de ectomicorriza. Entre eles encontram-se *Tricholoma terreum* e *Pinus sylvestris* (Mankel et al., 2000), *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus globulus* (Voiblet et al., 2001), *Tuber borchii* e *Tilia platyphyllus* (Polidori et al., 2002), *Laccaria bicolor* e *Pinus* sp. (Podila et al., 2002), *Paxillus involutus* e *Betula pendula* (Johansson et al., 2004), *Piloderma croceum* e *Quercus robur* (Frettinger et al.; 2007), *Pisolithus tinctorius* e *Castanea* sp. (Acioli-Santos et al.; 2008) entre outros.

Antes do contato físico, sinais moleculares trocados na rizosfera entre os simbiossantes em potencial, direcionam-os para o estágio inicial pré-simbiótico, mediados por uma variedade de eventos moleculares que levam à determinação da compatibilidade para a simbiose, por meio da ativação e repressão de vários genes no fungo e na planta (Kim et al., 1998; Martin et al., 2001; Podila et al., 2002; Duplessis et al., 2005; Krüger et al., 2004; Menotta et al., 2004; Zaretsky et al., 2006). Alguns exemplos de genes do fungo expressos em diferentes sistemas na fase pré-simbiótica são: genes codificando para citocromo P450, envolvido no metabolismo mitocondrial e um fator de transporte nuclear, envolvido na sinalização celular, foram expressos no sistema entre *Tuber borchii* e *Tilia americana* (Menotta et al., 2004); proteínas *heat shock* como as chaperonas, relacionadas à resposta a estresses, tiveram sua expressão diminuída no micélio do sistema entre *Pisolithus tinctorius* e *Castanea sativa* (Acioli-Santos et al., 2008) e entre *P. microcarpus* e *E. globulus* (Duplessis et al., 2005); genes envolvidos na beta oxidação peroxissomal de lipídeos e gliconeogênese, como acetil-CoA oxidase, acetil-CoA acetiltransferase (β -ceto tiolase) e malato sintase foram expressos no sistema entre *Laccaria bicolor* e *Pinus resinosa* (Podila et al., 2002), assim como genes codificando proteínas do canal de cálcio dependente de voltagem, proteínas do canal de potássio e ATPase, com função na regulação de fluxo de íons para sinalização (Podila et al., 2002); as quitinases também têm participação no estágio pré-simbiótico entre *Piloderma croceum* e *Quercus robur*, as quais são componentes estruturais primários da parede celular fúngica e podem atuar nas interações entre plantas e fungos (Frettinger et al., 2006).

Além desses, o gene que codifica malato sintase é expresso no fungo *Laccaria bicolor* em sistema com *Pinus resinosa*, o qual atua na via do glioxilato e funciona

como um desvio na via do ácido tricarboxílico, permitindo o crescimento das hifas em substrato de dois carbonos, absorvidos do meio ou gerados pelos processos catabólicos na célula, a partir de substratos estocados, como lipídeos (Balasubramanian et al., 2002). Genes codificando proteínas ligadas à parede celular fúngica, as hidrofobinas, foram relatadas em diversos trabalhos, porém, com dados contraditórios quanto ao aumento ou diminuição da expressão nessa fase pré-simbiótica. Os fungos *Pisolithus tinctorius*, associado com *Castanea sativa* (Acioli-Santos et al., 2008) e *P. involutus*, associado com *Betula pendula* (Le Quéré et al., 2005) apresentaram uma forte diminuição da expressão de genes que codificam hidrofobinas. Entretanto, na associação entre *P. microcarpus* e *E. globulus*, genes para hidrofobina tiveram sua expressão aumentada (Duplessis et al., 2005). Na planta são expressos genes codificando para metalotioneína e formato desidrogenase, envolvidas na resposta a estresses; inibidores de apoptose e proteínas de interação envolvidas no reconhecimento; expansina e fosfoglicerato mutase que agem no metabolismo e crescimento; e proteína receptora de ferormônio e quinases, envolvidas na percepção e transmissão de sinais (Krüger et al., 2004).

Para a determinação da compatibilidade, fatores de sinalização agem como elicitores, que são sintetizados por ambos os organismos. As células radiculares produzem elicitores que regulam a expressão de genes do fungo, ativando genes que codificam para proteínas envolvidas no estabelecimento da simbiose, como a formação da rede de Hartig e do manto fúngico e, reprimindo genes que codificam proteínas elicitoras de reações de defesa da planta (Buee et al., 2000; Salzer et al., 2000; Martin et al., 2001; Voiblet et al., 2001; Duplessis et al., 2005). Portanto, os diversos eventos moleculares que ocorrem durante a fase pré-simbiótica, assumem um papel crítico para o correto direcionamento e sucesso no estabelecimento da associação ectomicorrízica funcional (Martin & Tagu, 1999; Martin et al., 2001; Martin & Tagu, 2001; Sundaram et al., 2001; Bucher, 2007).

Após o reconhecimento mútuo, as raízes e o micélio iniciam o crescimento um em direção ao outro e estabelecem o contato físico e a adesão. À medida que a hifa vai gradualmente crescendo, mudanças na morfogênese fúngica e radicular ocorrem, formando o manto fúngico na extensão da raiz, que perde os pêlos radiculares e ocorre a diferenciação das hifas entre as células da epiderme e do córtex da raiz. E, finalmente,

há o estabelecimento da micorriza funcional (Martin et al., 1997; Martin et al., 2001; Sundaram et al., 2001; Le Quéré et al., 2005).

Entre os trabalhos que relatam genes expressos no tecido ectomicorrízico, estão as proteínas envolvidas na biossíntese de trealose e os transportadores de hexoses, importantes para permitir a entrada de hexoses nas hifas e gerar ATP, sintetizar aminoácidos e compostos de estocagem de carboidratos no sistema entre *L. bicolor* e *Populus tremula* (Nehls et al., 2001; López et al., 2008; Nehls, 2008); as hidrofobinas, expressas na simbiose entre *Tricholoma terreum* e *Pinus sylvestris* (Mankel et al., 2002) e entre *P. microcarpus* e *E. globulus* (Peter et al., 2003); citocromo C oxidase, transportador ABC e proteína ras-2 foram expressas na ectomicorriza formada entre *Terfezia boudieri* e *Cistus incanus* (Zaretsky et al., 2006); proteína relacionada à metalotioneína (Peter et al., 2003); gene codificando nucleosídeo difosfato quinase na simbiose entre *T. borchii* e *Tilia platyphyllos*, com função na geração de nucleosídeos trifosfatados, como GTP, importante para sínteses celulares e mecanismos de sinalização; além de sorbitol desidrogenase, uma enzima que converte sorbitol em glicose; e enolase, enzima que catalisa um passo na glicólise (Polidori et al., 2002).

Os genes mencionados são alguns exemplos das modificações na expressão para o estabelecimento das ectomicorrizas. Contudo, até agora, nenhum gene específico da micorriza foi encontrado, sugerindo que os programas metabólicos que levam à formação de uma simbiose funcional são dirigidos por mudanças na organização da rede de genes e na expressão de genes da planta e do fungo associado, isto é, que a interação de organismos simbióticos não ativa um programa genético específico, mas modifica o padrão de expressão gênica normal, que é observado em organismos não associados (Voiblet et al., 2001; Duplessis et al., 2005). A implicação coevolucionária é que a simbiose ectomicorriza não é somente uma justaposição das potencialidades genéticas dos simbiontes, mas modifica o padrão metabólico nas células das plantas e das hifas do fungo, sendo a mesma baseada, principalmente, na capacidade aumentada de captura do sistema radicular e nas trocas efetivas entre os simbiontes (Hibbett et al., 2000; Duplessis et al., 2005).

As estratégias moleculares convencionais e os experimentos de análises de genes em larga escala têm identificado vários genes expressos nas etapas de simbiose, as quais incluem análises comparativas *in silico*, utilizando as informações disponíveis em

bancos de dados de genomas seqüenciados ou de etiquetas de seqüências expressas e análises de expressão diferencial. A avaliação da regulação da expressão de genes é um importante mecanismo para controlar o desenvolvimento de ectomicorrizas (Duplessis et al., 2005). A técnica de PCR em tempo real tem sido usada para estudar muitos sistemas microbianos (Mackay, 2000; Mackay, 2004), mas somente recentemente tem sido usada para estudar fungos ectomicorrízicos (Landeweert et al., 2003; Schubert et al., 2003; Raidl et al., 2005; Parladé et al., 2007). O método de quantificação relativa aplicado a PCR em tempo real, permite estudar a expressão de genes alvos, em relação à expressão de um gene endógeno constitutivo.

Coelho (2008) construiu uma biblioteca subtrativa de cDNA para avaliar a expressão de genes do fungo ectomicorrízico *Hydnangium* sp. na fase pré-simbiótica com *E. grandis*. O autor identificou genes que codificam proteínas putativas relacionadas com o metabolismo de carboidrato (acetil-CoA acetiltransferase), de aminoácidos (metilmalonato semialdeído desidrogenase) e energético (ATP sintase, piruvato desidrogenase), transcrição e síntese de proteínas (RNA polimerase II, subunidade 40S, aspartil-tRNA sintetase), comunicação celular e transdução de sinal (canal seletivo de íon dependente de voltagem), resposta a estresse (proteínas citocromo P450, glutathione S-transferase e peroxirredoxina), transposons e proteínas relacionadas à biogênese de componentes celulares (hidrofobina e manoproteínas). Observou também a expressão por meio de RT-PCR quantitativo dos genes que codificam piruvato desidrogenase, ATP sintase, proteína do canal seletivo de íon dependente de voltagem, acetil-CoA acetiltransferase e hidrofobina. O aumento na expressão desses genes na fase de pré-interação confirmou a ativação de genes relacionados à β -oxidação e do metabolismo mitocondrial nessa fase da associação.

Espécies de fungos ectomicorrízicos filogeneticamente mais próximas a *Hydnangium* sp. foram avaliadas quanto a expressão diferencial de genes do fungo durante a formação de ectomicorriza. Na fase pré-simbiótica entre *L. bicolor* e *P. resinosa*, foram identificados genes envolvidos no metabolismo (β -oxidação de lipídeos e gliconeogênese, como acetil-CoA oxidase, acetil-CoA acetiltransferase, malato sintase, PEP carboxiquinase, gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase e glutathione peroxidase), na transdução de sinais (proteínas PF6.2, *ras*, quinases e receptores de quinases) e na síntese, regulação e transporte de proteínas (Podila et al., 2002).

Na associação entre *Pisolithus microcarpus* e *E. globulus* houve a expressão de genes que codificam proteínas de parede celular (hidrofobinas e manoproteínas) em quatro dias de inoculação; genes que codificam enzimas envolvidas na via glicolítica e no ciclo do ácido tricarboxílico (hexoquinase, NAD malato desidrogenase, aspartato aminotransferase, piruvato quinase, ATPase) em sete dias de inoculação; genes envolvidos na síntese e processamento de proteínas (proteínas ribossomais, fatores de elongação da tradução, proteassomo), atividade mitocondrial (isocitrato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase, malato desidrogenase, ubiquinona oxidoredutases, subunidades da ATP sintase), componentes da via de sinalização (*ras*, proteína quinase) e metabolismo de aminoácidos (NAD e NADP glutamato desidrogenase, transportador de metionina, histidina quinase) em 12 dias após a inoculação; e genes que codificam proteínas relacionadas ao transporte de amônia e proteína ribossomal 40S em 21 dias após a inoculação (Duplessis et al., 2005).

Para *Hebeloma cylindrosporum* vários trabalhos tem caracterizado genes que codificam proteínas de membrana, com função no transporte de nutrientes, como fósforo, potássio e nitrogênio (Javelle et al., 2001; Wipf et al., 2002; Lambilliotte et al., 2004; Mameisse et al., 2004) e identificado genes que codificam hidrofobinas, visto que esses genes são altamente expressos em *Hebeloma* (Lambilliotte et al., 2004).

Nesses sistemas, o nível de expressão dos transcritos possui variações quantitativas significantes para funções relacionadas nos diferentes fungos ectomicorrízicos e essa variação pode dificultar a análise de expressão de genes. Além disso, sabe-se que genes importantes na regulação da expressão e na transdução de sinal são freqüentemente expressos em baixos níveis e podem ser sub-representados em bibliotecas de EST (Martin et al., 2001).

5. Análises das seqüências e caracterização de organização gênica em fungos

Estratégias experimentais aliadas aos recursos computacionais têm oferecido métodos para a identificação de características padrões e suas divergências entre os mais diversos organismos. Isto só está sendo possível devido ao número exponencial de projetos genoma que, para os organismos do reino Fungi, já se encontram seqüenciados

e depositados 12 fungos do filo Basidiomycota e 81 fungos do filo Ascomycota (subfilos Pezizomycotina, Saccharomycotina e Schizosaccharomycotina), incluindo diferentes isolados da mesma espécie, além de inúmeros genomas com seu sequenciamento não finalizado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas sequências encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Os principais institutos responsáveis por esses sequenciamentos são o *Broad Institute* (Cambridge, Inglaterra), *DOE Joint Genome Institute* (Califórnia, EUA) e *Genoscope (Centre national de séquençage)* (Evry, França). Informações desses projetos estão trazendo e ainda irão proporcionar avanços nas áreas médica, biotecnológica e na agricultura. Entretanto, a maioria dos genes codificadores de proteínas desses genomas não estão sendo caracterizados experimentalmente, tornando essencial a utilização de métodos automatizados de predição de genes (Rep et al., 2006).

Para uma definição mais acurada da estrutura gênica, como a identificação de alvos potenciais de regulação do processamento de íntrons, um mecanismo comum de controle gênico em eucariotos, a anotação genômica de íntrons é necessária (Mitrovich et al., 2007). As regiões excisadas para a formação do mRNA maduro foram denominadas por Gilbert (1978) de íntrons. Os íntrons são regiões intragênicas alternadas com regiões expressas, os éxons. Segundo Yu e colaboradores (2002), o polimorfismo inserção-deleção na região intrônica revela a tentativa de manter o tamanho do íntron.

Apesar dos éxons serem relativamente longos em fungos, o estudo sobre íntrons demonstrou que eles possuem tamanhos pequenos, diferente dos mamíferos e plantas (Kupfer et al., 2004). Mesmo apresentando tamanhos pequenos, a maioria dos genes que codificam proteínas em fungos filamentosos, cerca de 68 % contêm íntrons, e muitos deles contêm múltiplos íntrons em uma mesma região estrutural do gene (Gurr et al., 1987). Contudo, muitos genes também já foram descritos não possuindo íntrons, sendo uma evidência evolucionária que esses genes foram transferidos diretamente a partir de procariotos (Ramon et al., 1987).

O número de íntrons varia grandemente em eucariotos e no reino Fungi essa variação se mantém alta. Nas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliada uma densidade de 0,9 e 0,05 íntrons por gene, respectivamente

(Wood et al., 2002; Hirschman et al., 2006). Entretanto, de dois a três íntrons por gene foram identificados nos genomas de *Neurospora crassa* e de *Aspergillus nidulans* (Galagan et al., 2003; Galagan et al., 2005). Interessantemente, basidiomicetos e zigomicetos apresentam uma das mais elevadas densidades de íntrons entre os eucariotos, de quatro a seis íntrons por gene (Martinez et al., 2004; Loftus et al., 2005).

O genoma do fungo basidiomiceto *L. bicolor*, recentemente seqüenciado, é monofilético ao fungo *Hydnangium* sp., contém um tamanho médio de 93 pb por íntron, porém, apresenta 10 % dos íntrons com um comprimento superior a 150 pb (Martin et al., 2008). Comparando a média do comprimento de íntrons em outros fungos basidiomicetos seqüenciados, temos 117 pb em *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez et al., 2004), 75 pb para *Coprinopsis cinerea* (Fitzpatrick et al., 2006), 66 pb para *Cryptococcus neoformans* (Heitman et al., 1999) e 127 pb para *Ustilago maydis* (Kämper et al., 2006).

Para obter uma média do comprimento de íntrons entre fungos filamentosos, Kinghorn & Turner (1992), comparando íntrons de diferentes espécies, chegaram em um comprimento médio de 69 pb. O tamanho dos íntrons que eles analisaram variava de 36 pb a 256 pb. Eles verificaram também que a posição dos íntrons dentro do gene correspondente é geralmente conservada em diferentes espécies, embora o comprimento possa variar.

A expressão gênica em fungos, assim como em eucariotos superiores, depende de uma via de processamento dos íntrons coordenada pelo complexo de proteínas e RNA. Em sistemas metazoários, o complexo de proteínas e RNA é composto por cinco pequenos RNAs nucleares e mais de 60 proteínas que funcionam como fatores de processamento de íntrons (Kupfer et al., 2004). O complexo de proteínas e RNA interage com conservados *cis* elementos, identificando corretamente os sítios de excisão 5' e 3' (Maniatis & Tasic, 2002). Esse complexo facilita a correta excisão das seqüências dos íntrons e a ligação das seqüências de éxons. Esses eventos são necessários para a obtenção de mRNA maduro, contendo a seqüência aberta de leitura (ORF) que pode ser traduzida em uma proteína funcional (Maniatis & Tasic, 2002; Kupfer et al., 2004).

Íntrons geralmente começam com GT e terminam com o motivo dinucleotídeo AG, os quais se referem aos sítios de processamento doador (5') e receptor (3'),

respectivamente. Entretanto, íntrons com sítios de excisão não canônicos têm sido identificados e eles têm o potencial de dificultar acuradas predições de genes. Estabelecer se o organismo ou um grupo de organismos tem as isoformas alternativas em íntrons é importante para estimar a frequência desses sítios de processamento não canônicos e assim, melhorar os programas de análises de seqüências genômicas.

Baseado em comparações de seqüências de cDNA e DNA genômico de mamíferos, mais de 90 % dos íntrons não canônicos têm sítios de processamento GC-AG (Burset et al., 2000). Além disso, também foram relatados alguns íntrons não canônicos em leveduras e fungos filamentosos, os quais igualmente são sítios de processamento GC-AG. Esses sítios 5' GC são consistentes com observações experimentais que, de seis possíveis pontos de mutações dentro do dinucleotídeo canônico GT, mutação de T para C na posição 2 apresenta o menor efeito no processo de excisão *in vitro* (Aebi et al., 1986; Mount, 2000). Portanto, isso indica que identificar estes sítios não canônicos GC-AG é de grande importância para a predição acurada de genes (Burset et al., 2000; Davis et al., 2000).

Entre os eucariotos, as características de íntrons e de éxons variam e essas diferenças influenciam os mecanismos de reconhecimento, processamento dos íntrons e junção dos éxons adjacentes. Dessa forma, o conteúdo 5' e 3' dos íntrons, sítios de ramificação, conteúdo da região dos éxons adjacentes aos íntrons e a localização de traços de polipirimidina tem o potencial de influenciar o mecanismo de processamento dos íntrons (Kupfer et al., 2004). A identificação desses elementos pode ajudar no entendimento dos mecanismos de regulação de genes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Genética Molecular de Microrganismos e de Associações Micorrízicas, localizados no BIOAGRO, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

1. Crescimento e manutenção do fungo *Hydnangium* sp.

As culturas do fungo *Hydnangium* sp. (isolado D21), pertencentes à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa/MG, foram mantidas em placas de Petri contendo meio Melin Norkrans sólido, modificado (meio MNM) (Marx, 1969). Sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar, o isolado D21 foi transferido, a cada vinte dias, para meio de mesma composição e mesma quantidade (30 mL de meio MNM por placa). As placas foram mantidas incubadas a 28 ± 1 °C em incubadora do tipo B.O.D. até o momento de utilização das culturas. O micélio utilizado para as inoculações no sistema *in vitro* foi proveniente de uma mesma placa mantida nas mesmas condições.

2. Desinfestação das sementes e produção de plântulas de *Eucalyptus grandis*

Sementes de *Eucalyptus grandis* (0,4 a 0,7 mm de diâmetro) foram desinfestadas superficialmente pela imersão em etanol a 70 % por um minuto, sob agitação, seguindo-se de uma lavagem em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram

imersas em peróxido de hidrogênio a 20 % por seis minutos, seguida de três enxágües com água destilada autoclavada. As sementes foram transferidas para placas de Petri ($\varnothing = 90$ mm) contendo meio de micorrização (Burgess et al., 1996) coberto com papel celofane e incubadas a 28 °C por 3 dias. Após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para uma nova placa de Petri com meio de micorrização (Burgess et al., 1996), cobrindo 2/3 da placa. Todo esse processo foi realizado sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. As placas foram seladas, inclinadas com um ângulo de 70° e transferidas para câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 °C $\pm$ 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por lâmpadas fluorescentes brancas. No período de desenvolvimento das plântulas, o monitoramento diário do aparecimento de contaminações foi realizado e, quando verificado, as placas eram descartadas.

3. Estabelecimento da associação ectomicorrízica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* utilizando a micorrização *in vitro*

As sínteses *in vitro* foram feitas segundo o protocolo descrito por Burgess et al. (1996), com modificações, quanto ao crescimento prévio das plântulas de *E. grandis* antes da inoculação com o fungo.

Após 10 dias de crescimento das plântulas na câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 °C $\pm$ 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, as plântulas foram redistribuídas em novas placas de Petri contendo meio de micorrização cobrindo 2/3 da placa, cinco plântulas por placa, apresentando o mesmo tamanho de radícula. As placas foram seladas e novamente transferidas para a câmara de crescimento. Após três dias para a adaptação das plântulas no meio de cultura, foram inoculados discos de meio de cultura de 6 mm de diâmetro contendo micélio, retirados das bordas de colônias de *Hydnangium* sp. cultivados durante 7 dias em meio MNM. Foram inoculados cinco discos contendo micélio fúngico em cada placa, um para cada plântula. Os discos foram depositados ao lado de cada raiz, na altura mediana, a uma distância aproximada de 0,7 cm e as placas foram incubadas novamente em câmara de crescimento.

Nas placas de Petri dos tratamentos controles, plântulas não inoculadas e micélio em cultura axênica, foram mantidas de forma idêntica, sob condições assépticas e igualmente, mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por lâmpadas fluorescentes brancas.

Foram coletadas as raízes de 130 plântulas em cada fase, em cinco, 10 e 20 dias após a inoculação com o fungo. As amostras frescas foram congeladas, para a extração de RNA total, e outras foram mantidas em FAA 5:90:5 (formaldeído: etanol: ácido acético) para a caracterização microscópica.

4. Avaliação e monitoramento das fases de formação da ectomicorriza

Amostras de raízes crescidas na presença do fungo e amostras de raízes controle, não inoculadas com o fungo, foram coletadas aos cinco, 10 e 20 dias após a inoculação. Foram realizadas análises morfológicas sob lupa e cortes em criomicrotomo e observação sob microscópio de luz.

Os fragmentos de raízes foram avaliados morfológicamente por meio de observação sob lupa estereoscópica (Olympus Modelo SZH10) e fotografadas com câmera digital QColor3 (Olympus PM-C353X).

As raízes amostradas foram preservadas em FAA 5:90:5 (formaldeído: etanol: ácido acético). Para avaliação microscópica das estruturas, as ectomicorrizas ou raízes, armazenadas em FAA, foram transferidas para solução de tampão fosfato 0,2 M, acrescido de sacarose, em uma concentração de 20 %, durante uma noite a 4 °C. Para a realização dos cortes transversais, as ectomicorrizas foram emblocadas em resina (Jung Tissue Freezing Medium TD) e então seccionadas entre 15 a 25 μm de espessura em criomicrotomo (Leica Modelo CM 1850), a -25 °C. Os cortes foram coletados, depositados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 0,05 % contendo glicerol (1:1) e observados sob microscópio (Olympus Modelo IX50) e fotografadas com câmera digital QColor3 (Olympus PM-C35DX).

5. Extração de RNA total

Amostras de micélio do fungo, das raízes da planta e do tecido ectomicorrízico foram separadamente coletadas e armazenadas a -20 °C para a posterior extração de RNA total. A Figura 1 mostra o esquema de planejamento experimental.

O RNA total foi extraído utilizando o *SV Total RNA Isolation System Kit* (Promega®) e o Tri® Reagente (Sigma®, USA). Adicionalmente, as amostras foram tratadas com DNase RQI RNase-free (Promega®). O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (Pharmacia Biotech. Ultrospec® 3000).

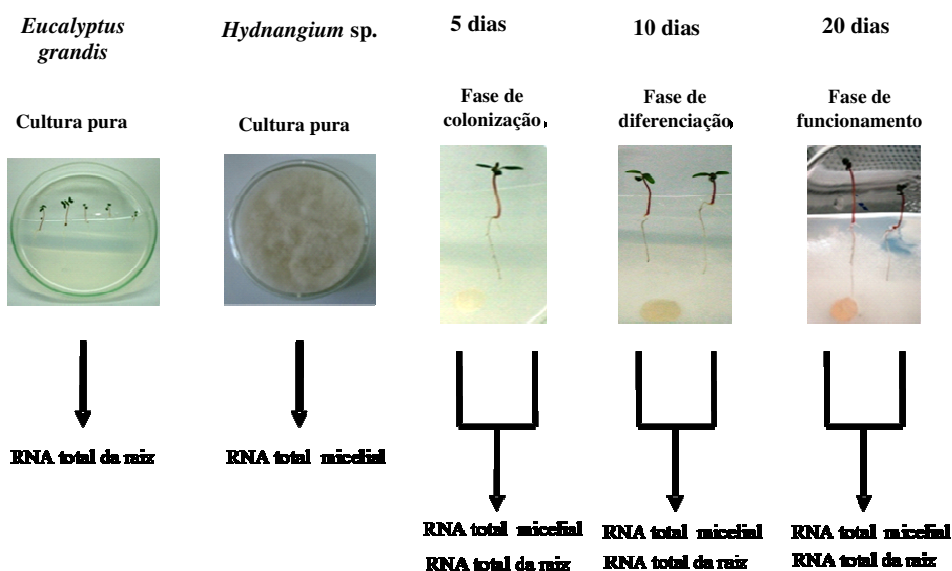


Figura 1. Esquema demonstrando os passos experimentais. As amostras dos controles (culturas puras de *Eucalyptus grandis* e de *Hydnangium sp.*) e as fases de cinco, 10 e 20 dias após a inoculação com o fungo, para a formação de ectomicorriza, foram coletadas para a extração de RNA total.

6. Extração de DNA total

Para a extração de DNA total, fragmentos de micélio do fungo *Hydnangium* sp., cultivados em meio MNM sólido foram inoculados em meio MNM líquido e mantidos a 28 °C por 20 dias. Após, o micélio foi coletado, desidratado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -20 °C. A extração de DNA total foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Specht et al. (1982), com modificações segundo Medina (2001).

A quantidade de DNA foi determinada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000), a 260 nm, sendo verificada sua integridade por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O gel foi analisado sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando sistema de captura de imagem *Eagle-eye* (Stratagene®).

7. Amplificação e caracterização dos íntrons das seqüências parciais dos genes *atp* e *aat* em *Hydnangium* sp.

A fim de identificar íntrons putativos nas seqüências de genes codificadores de ATP sintase (*atp*) e de acetil-CoA acetiltransferase (*aat*) de *Hydnangium* sp., foram feitas buscas em bancos de dados disponíveis na web. Ferramentas como BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e *Advanced Search and Gene Ontology* do banco de dados do genoma de *Laccaria bicolor* (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) além do banco de dados INRA (*L'Institut National de la Recherche Agronomique*) também de *Laccaria bicolor* (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/LaccariaGenome/>) foram utilizados.

De posse das seqüências genômicas e de cDNA dos genes correspondentes de *L. bicolor*, o alinhamento dessas seqüências com as seqüências parciais de *Hydnangium* sp. foi realizada utilizando o software MEGA4 (Tamura et al., 2007), por meio da ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994). Dessa forma, puderam-se identificar os possíveis íntrons presentes no genoma de *Hydnangium* sp. Oligonucleotídeos foram construídos utilizando o programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (<http://frodo.wi.mit.edu/>), visando à amplificação dos possíveis íntrons presentes no genoma de *Hydnangium* sp.

Os oligonucleotídeos desenhados para a amplificação de íntrons dos genes codificando as proteínas ATP e AAT estão apresentados na Tabela 1.

Para as reações de amplificação foram utilizados: 2 µM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada desoxinucleosídeo trifosfatado (dNTPs), Tampão IB 1 X e 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) e 50 ng DNA total de *Hydnangium* sp. (D21). As condições de amplificação foram as seguintes: 1 minuto a 94 °C de desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C, e ainda um passo final de elongação consistindo de 5 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, analisados sob luz ultravioleta e sua imagem digitalizada utilizando sistema de captura de imagem *Eagle-eye* (Stratagene®).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados por ExoSAP-IT® (usb® - Affymetrix®), as amostras foram seqüenciadas e as seqüências analisadas e processadas em programas a fim de buscar regiões intrônicas. Foram utilizados os programas MEGA4 (Tamura et al., 2007), BioEdit (Hall, 1999), Augustus (Stanke & Waack, 2003).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de seqüências genômicas de *Hydnangium* sp.

Gene	Oligonucleotídeos	Seqüência 5' - 3'
<i>atp</i>	D10SH3GENL3	GGCAGGTACATCACCGAAG
	D10SH3GENR3	ATTAACAAATCCTCCTCCTTCC
<i>aat</i>	H01SH3GENL2	GACAAGATCCCATCCCTCAA
	H01SH3GENR2	TGATCGTGTTTATTCCAATAAGTG

8. Análise filogenética dos genes *atp* e *aat*

As seqüências de cDNA dos genes *atp* e *aat* foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1997), processada pelo algoritmo BLASTN. As seqüências que

apresentaram menor valor E foram exportadas no formato FASTA. O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado pelo programa MEGA4 (Tamura et al., 2007), utilizando a ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994), e editado pelo programa BioEdit (Hall, 1999).

Para verificar a relação filogenética entre as seqüências dos genes *atp* e *aat* com outros organismos, foram utilizadas seqüências de aminoácidos. As seqüências de aminoácidos foram deduzidas a partir das seqüências nucleotídicas. A análise filogenética foi realizada utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-Joining* - NJ) no programa MEGA4 (Tamura et al., 2007).

A lista dos organismos utilizados para as análises filogenéticas, o número de acesso no NCBI e a classificação estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Organismos utilizados nas análises filogenéticas das seqüências de aminoácidos do gene que codifica ATP sintase.

Organismo	Nº de acesso	Classificação (Filó/Subfiló)
<i>Hydnangium</i> sp. D21	D10SH3 (não depositado)	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	170089110	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	58271359	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Ustilago maydis</i> 521	71006197	Basidiomycota - Ustilaginomycotina
<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239	149238723	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	126138815	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260	61652209	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	164423467	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	116204570	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	156043356	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	50423336	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> DSM 70294	156844097	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Coccidioides immitis</i> RS	119190058	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Ajellomyces capsulatus</i> NAm1	154274989	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140	50306984	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	46107507	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Candida glabrata</i> CBS138	50285562	Ascomycota - Saccharomycotina
<i>Candida albicans</i> SC5314	68487913	Ascomycota - Saccharomycotina

Tabela 3. Organismos utilizados nas análises filogenéticas das seqüências de aminoácidos do gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase.

Organismo	Nº de acesso	Classificação (Filo/Subfilo)
<i>Hydnangium</i> sp. D21	H01SH3 (não depositado)	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	170089110	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	169860938	Basidiomycota - Agaricomycotina
<i>Ustilago maydis</i> 521	71018974	Basidiomycota - Ustilaginomycotina
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	169606635	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	116195857	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	156061554	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	39952224	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	70992890	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	46121416	Ascomycota - Pezizomycotina
<i>Salmo salar</i> clone ssal-rgf-524-162	209155133	Chordata - Vertebrata
<i>Danio rerio</i>	51230649	Chordata - Vertebrata
<i>Xenopus laevis</i>	148227462	Chordata - Vertebrata
<i>Gallus gallus</i>	118085056	Chordata - Vertebrata
<i>Monodelphis domestica</i>	126327065	Chordata - Vertebrata
<i>Canis familiaris</i>	73955188	Chordata - Vertebrata
<i>Equus caballus</i>	194212649	Chordata - Vertebrata
<i>Bos taurus</i>	114050958	Chordata - Vertebrata

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Formação de ectomicorriza por meio de síntese *in vitro* e avaliação morfológica das raízes nas diferentes fases de formação da ectomicorriza

No sistema de micorrização *in vitro* montado, foi verificada a capacidade do fungo *Hydnangium* sp. formar ectomicorrizas com *E. grandis*. A formação de ectomicorrizas entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* foi obtida com sucesso (Figura 2).

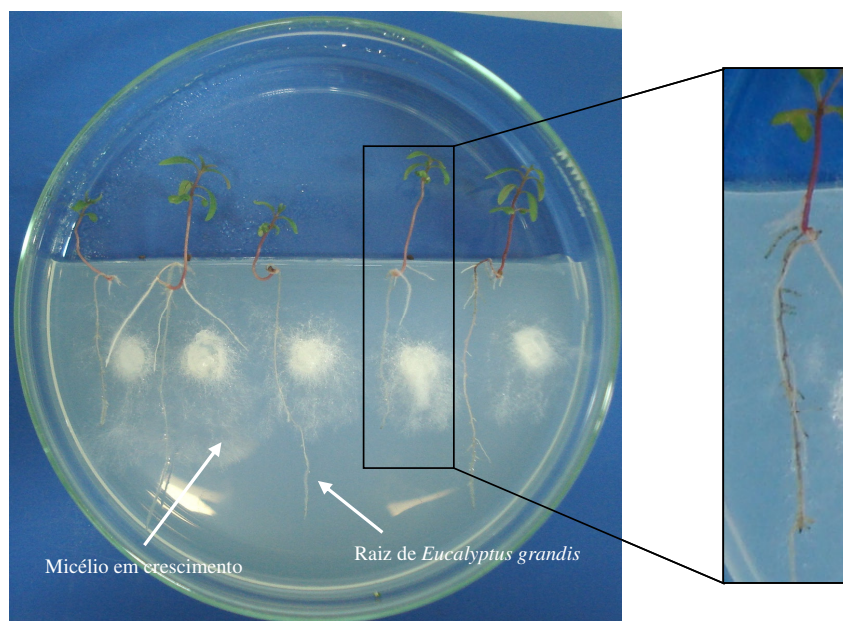


Figura 2. Micorrização *in vitro*. Plântulas de *Eucalyptus grandis* após 20 dias de inoculação com o fungo *Hydnangium* sp. Em destaque observam-se as ectomicorrizas formadas ao longo da raiz de *E. grandis* após 20 dias de inoculação.

Foram verificadas mudanças morfológicas típicas nas raízes, quando em contato com o fungo. Os pêlos radiculares diminuíram até desaparecer, a raiz tornou-se mais espessa e ramificada, além da mudança de cor e de textura (Figura 3).

O contato do micélio com as raízes das plântulas *in vitro* foi observado após três dias da inoculação. Após cinco dias de inoculação foi observado que o micélio começou a colonizar a raiz, crescendo em torno da mesma e avançando por toda a extensão radicular, caracterizando a fase de colonização. A Figura 3 mostra o crescimento micelial em torno da raiz, no início da colonização (a) e em um estágio mais avançado (b), envolvendo toda a raiz. Verificou-se que o micélio cresceu por toda a raiz, porém, apenas em alguns pontos houve a formação de ectomicorriza típica, nas avaliações após 20 dias de inoculação com *Hydnangium* sp.

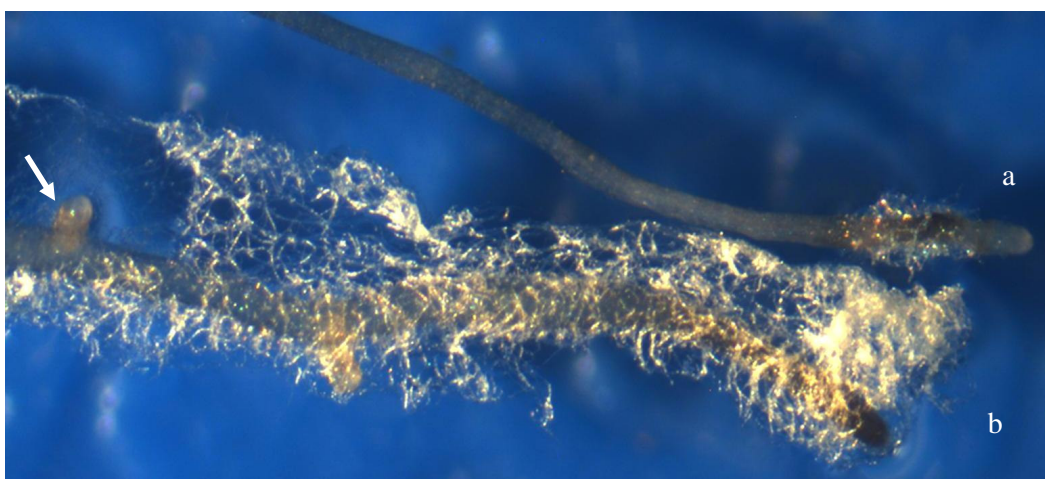
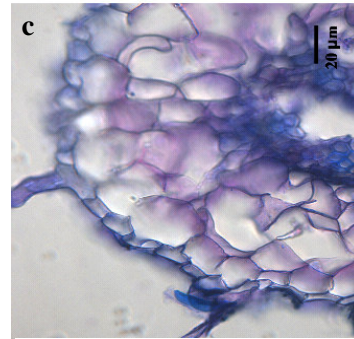
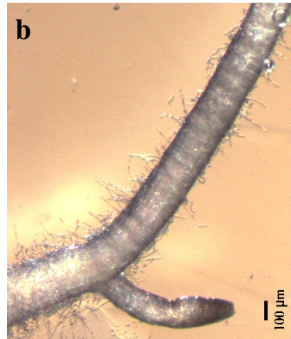
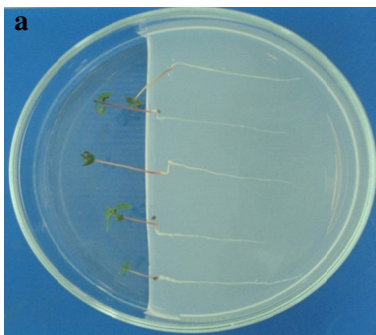
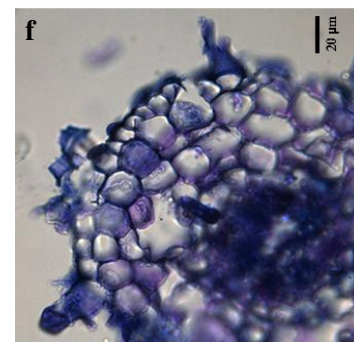
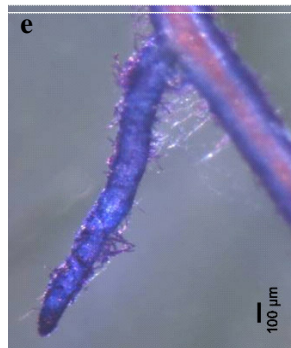
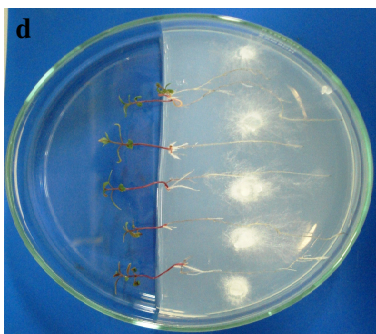


Figura 3. Raiz de *Eucalyptus grandis* colonizada parcialmente (a) e apresentando uma vasta colonização (b). A seta mostra uma ramificação da raiz, mais espessa e coberta por micélio, após 20 dias de inoculação com *Hydnangium* sp.

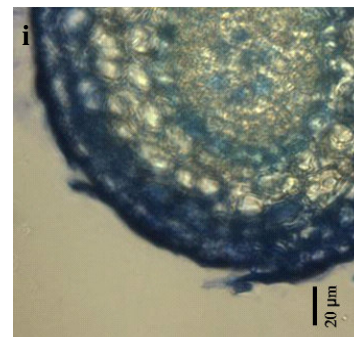
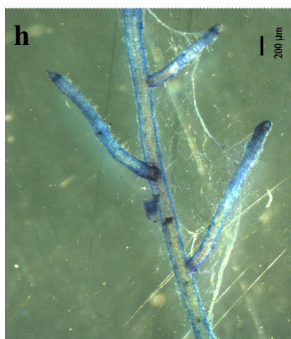
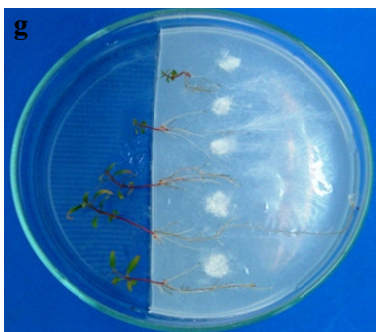
Com os cortes transversais das raízes não inoculadas e das raízes inoculadas nos períodos de cinco, 10 e 20 dias, foi observado o crescimento da planta e do fungo nas diferentes fases da interação ectomicorrízica, com o avanço do micélio fúngico sobre as raízes e a expansão por todo o meio de cultivo (Figura 4, a – d).



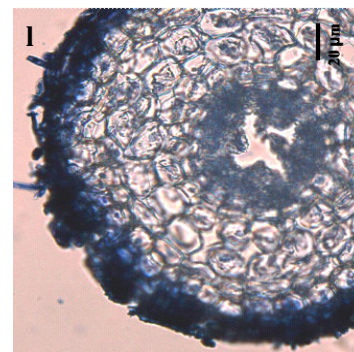
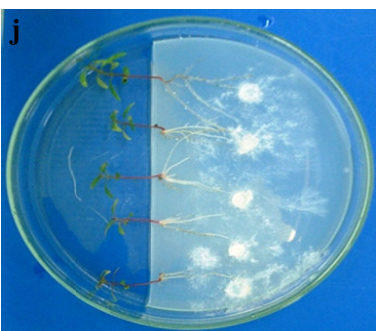
controle



5 dias



10 dias



20 dias

Figura 4. Fases da micorrização *in vitro* entre *Eucalyptus grandis* e *Hydnangium* sp. Placas contendo as plântulas de *Eucalyptus grandis* após cinco (d), 10 (g) e 20 dias (j) de inoculação com o micélio de *Hydnangium* sp., e a placa controle (a); observação sob lupa de raízes de *Eucalyptus grandis* inoculadas após cinco (e), 10 (h) e 20 dias (k), e o controle (b); cortes transversais em microscopia óptica de raízes de *Eucalyptus grandis* inoculadas em cinco (f), 10 (i) e 20 dias (l), e o controle (c). As escalas estão apresentadas para cada uma das figuras. Para a visualização das estruturas fúngicas, as amostras foram coradas com o corante básico azul de toluidina 0,05 %.

Nas análises feitas sob lupa foi observada a crescente diminuição dos pêlos radiculares durante as diferentes fases (Figura 4 – e, f, g, h). As raízes não inoculadas, que correspondem ao controle, apresentaram inúmeros pêlos, enquanto que as raízes que foram inoculadas apresentaram uma diminuição dos pêlos e a presença das hifas em torno da raiz.

Nos cortes transversais foi observado o estabelecimento da estrutura da ectomicorriza. O manto foi observado após 10 dias de inoculação, tornando-se mais espesso após 20 dias (Figura 4 – k, l). O manto foi constituído de uma camada de hifas, variando de 7 a 10 μm de espessura. As hifas que penetraram na raiz e formaram a rede de Hartig ficaram limitadas a camada de células da epiderme. A formação da rede de Hartig apenas na primeira camada de células epidérmicas da raiz, ou apresentando uma pequena extensão na segunda camada, é típica de ectomicorrizas formadas em eucaliptos e em outras angiospermas (Brundrett et al., 1996; Peterson et al., 2004). A Figura 5 mostra um corte transversal da raiz colonizada após 20 dias de inoculação, mostrando em detalhe o manto e a rede de Hartig.

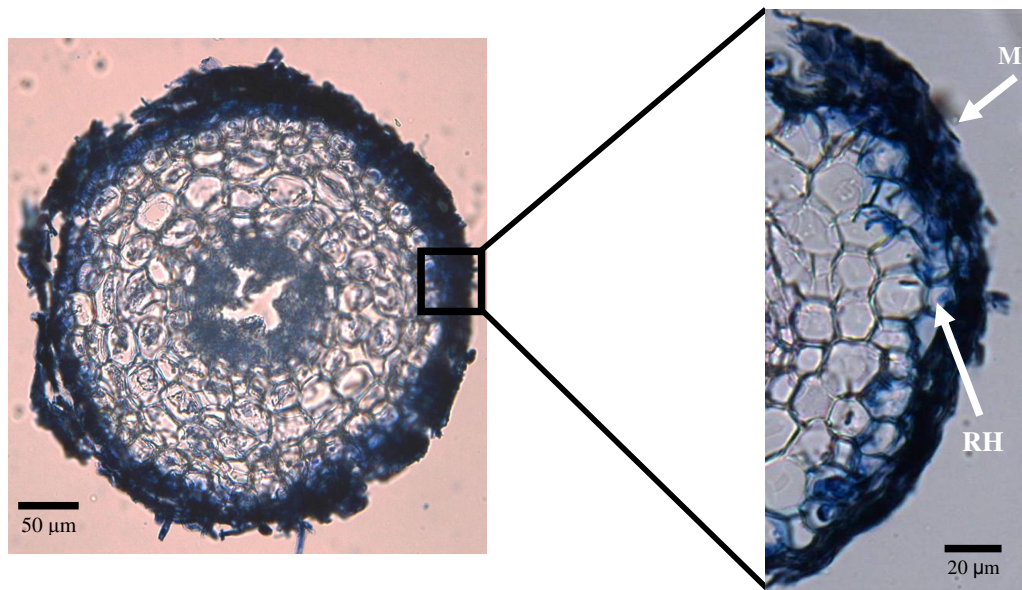


Figura 5. Corte transversal de raiz de *Eucalyptus grandis* ectomicorrizada por *Hydnangium* sp. (a) e, em detalhe, mostrando o manto e a rede de Hartig (b). M = manto; RH = rede de Hartig.

Sistemas de cultivo *in vitro* entre vários fungos ectomicorrízicos com diferentes espécies arbóreas foram estabelecidos, como para castanheira, álamo, pinus e eucaliptos (Kottke et al., 1987; Hilbert et al., 1991; Hampp et al., 1996; Hermann et al., 1998). A formação micorrízica *in vitro* para essas espécies possibilitou a avaliação do monitoramento das fases em outras espécies. Cada fase nos processos de formação ectomicorrízica é caracterizada por mudanças na morfologia e na fisiologia, com o desaparecimento e/ou a formação de estruturas. O tempo de formação e duração de cada fase depende dos organismos simbióticos envolvidos e é devido à variação no número de genes e a amplitude de expressão desses genes, sendo mais evidente nas primeiras fases do desenvolvimento da ectomicorriza, logo após o contato.

Para *Hydnangium* sp. e *E. grandis*, a fase de colonização foi estabelecida após cinco dias de inoculação. Após 10 dias de inoculação, o micélio avançou por toda a extensão da raiz de *E. grandis* e o manto começou a ser formado, caracterizando a fase de diferenciação. Após 20 dias iniciou a fase de funcionamento, com a penetração intercelular das hifas na raiz, estabelecendo a rede de Hartig e as trocas nutricionais entre fungo e planta. Campos (2003) avaliou a formação de ectomicorriza entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis*, utilizando o sistema *in vitro* descrito por Muchovej e Kasuya (1987), em tubos de vidro, e verificou a formação de ectomicorriza típica e de basidiocarpos após três meses de inoculação. Moore et al. (1989), verificaram o estabelecimento da colonização entre *Hydnangium carneum* e *Eucalyptus pilularis* mantidos em tubos de cultivo em 14 dias e a formação de ectomicorrizas após quatro meses de inoculação.

O isolado de *Pisolithus tinctorius* com especificidade para eucalipto inicia a colonização após dois dias de inoculação, após quatro dias avança para a fase de diferenciação e estabelece a ectomicorriza após 15 dias de inoculação em *E. globulus* (Martin & Hilbert, 1991; Tagu & Martin, 1995; Podila et al., 2002). Na interação entre *Betula pendula* e *Paxillus involutus*, o manto começa a se formar em dois dias, no oitavo dia é visível a rede de Hartig e a micorriza funcional é formada depois de 21 dias (Johansson et al., 2004). Entre *Pinus sylvestris* e *L. bicolor*, a colonização das raízes laterais é visível após 15 dias e a formação da

rede de Hartig em 30 dias. Já para a interação de *P. resinosa* e *L. bicolor*, a formação de ectomicorriza ocorre após 40 dias de inoculação (Podila et al., 2002).

A avaliação do desenvolvimento ectomicorrízico, associada a suas mudanças bioquímicas e fisiológicas, requer o uso de sistemas de síntese de micorriza simples e reproduzíveis, em um ambiente axênico (Malajczuk et al., 1990; Burgess et al., 1996; Kim et al., 1999). A micorrização *in vitro* é uma ferramenta de grande relevância para os estudos das fases de colonização, diferenciação e funcionamento da associação ectomicorrízica do fungo *Hydnangium* sp. e *E. grandis*, e para a avaliação da expressão de genes envolvidos na interação.

A quantidade de RNA total extraído de cada uma das fases de formação da ectomicorriza na associação entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis* não foi suficiente para detectar os transcritos dos genes, como também para os genes de expressão constitutiva. Obtivemos um valor aproximado de 3,8 µg/µL na extração de RNA total do material coletado proveniente de 30 placas de Petri para cada fase de formação da ectomicorriza no sistema de micorrização *in vitro*. A partir dessa quantidade, obtivemos um valor aproximado de 140 ng de cDNA em cada uma das fases para a análise de RT-PCR. Essas quantidades seriam suficientes para a detecção dos transcritos. Entretanto, a quantidade de RNA total necessária para a avaliação da expressão de genes varia entre as diferentes associações entre fungos ectomicorrízicos e plantas e entre os transcritos analisados. Além disso, deve ser considerado que o RNA total obtido do material colonizado inclui as células da planta do cilindro central e células do fungo que não estão diretamente envolvidas na simbiose ectomicorrízica. Isto pode dificultar a identificação do padrão de expressão das células que estão diretamente envolvidas na simbiose (Wiemken & Boller, 2002).

Dessa forma, na associação entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis* o insucesso na detecção dos transcritos evidenciou pouca quantidade de mRNA presente na preparação de RNA total. Para as análises posteriores de expressão de genes de *Hydnangium* sp. em interação com *E. grandis* faz-se necessário ajustar a técnica de micorrização empregada e a quantidade de material biológico coletado.

2. Caracterização de íntrons nas seqüências parciais dos genes *atp* e *aat* em *Hydnangium* sp.

Os genes *atp* e *aat* codificam proteínas com funções importantes no metabolismo dos fungos. O complexo da ATP sintase faz parte do processo de fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons, bombeando prótons para fora da membrana interna mitocondrial, formando um gradiente eletroquímico, sendo esta energia transformada em energia química da ligação ADP + fosfato inorgânico gerando ATP. Atividade mitocondrial foi fortemente evidenciada em ectomicorrizas formadas, apresentando alto número de mitocôndrias nas hifas da rede de Hartig (Massicotte et al., 1987; Smith & Read, 1997). Além dos genes que codificam as subunidades do complexo da ATP sintase, outros genes que codificam proteínas relacionadas à cadeia respiratória foram expressos na formação do manto e da rede de Hartig da interação ectomicorrízica entre *Betula pendula* e *P. involutus* (Le Quéré et al., 2005).

Acetil-CoA acetiltransferase (AAT) é uma enzima da via de β -oxidação que degrada longas cadeias de ácido graxo em moléculas de acetil-CoA. A provável função da enzima AAT na simbiose ectomicorrízica é a geração de dois compostos de carbono a partir de lipídios estocados e a geração de acetoacetil-CoA no início da interação entre fungo e planta, o que facilitaria a transferência e a utilização de carbono pelo fungo, permitindo o crescimento das hifas (Balasubramanian et al., 2002; Hiremath et al., 2006). Quinze por cento dos genes diferencialmente expressos no fungo *Laccaria laccata* na fase pré-simbiótica da associação com *Pinus resinosa* eram relacionados ao metabolismo, entre eles acetil-CoA oxidase, β -ceto tiolase e malato sintase (Podila et al., 2002). Foi observada na fase pré-simbiótica de *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis*, aumento da expressão de vários genes, dentre eles os que codificam para ATP sintase e acetil-CoA acetiltransferase (Coelho, 2008).

O posicionamento dos íntrons nos genes que codificam as proteínas ATP sintase (*atp*) e acetil-CoA acetiltransferase (*aat*) foi obtida por meio do alinhamento das seqüências de cDNA de *Hydnangium* sp. com as seqüências de cDNA e do DNA genômico de *Laccaria bicolor*. A análise do gene completo de

L. bicolor demonstrou a presença de nove íntrons interrompendo o gene *atp* (Figura 7) e de cinco íntrons para o gene *aat* (Figura 8). A identificação correta de todos os íntrons é necessária para avaliar a organização dos genes que codificam proteínas em eucariotos.

Os oligonucleotídeos estão representados na Tabela 1 e suas regiões de identidade nas seqüências estão mostradas nas Figuras 7 e 8.

Fragmentos de DNA de 585 pb e de 661 pb foram amplificados com os oligonucleotídeos D10GENL3/D10GENR3 e H01GENL2/H01GENR2, respectivamente (Figura 6). O fragmento de DNA de 585 pb corresponde à seqüência parcial do gene que codifica ATP sintase e o fragmento de 661 pb corresponde à seqüência parcial do gene *aat* de *Hydnangium* sp.

Os fragmentos de DNA amplificados foram seqüenciados e as seqüências de cDNA e DNA genômico de *Hydnangium* sp. e de *L. bicolor* para os genes que codificam ATP sintase e acetil-CoA acetiltransferase foram alinhados, confirmando a presença de dois íntrons no gene *atp* e de três íntrons no gene *aat* (Figuras 7 e 8).

No caso do gene *atp* de *Hydnangium* sp., o tamanho dos íntrons foi de 53 pb, na posição 1.691; e 65 pb, na posição 1.874, os quais apresentam tamanhos que tem sido observados para a maioria dos íntrons em fungos, variando de 49 a 85 pb (Unkless et al., 1992). Também foi verificada a presença de sítios conservados de processamento de íntrons, 5' GT – 3' AG (Padgett et al., 1984) (Figura 7).

Em *Hydnangium* sp., o íntron localizado na posição 1.691 apresenta sítio de processamento dinucleotídica 5' GT, comumente observado em outros fungos, mas não apresenta a seqüência 5' GTA e sim, a forma 5' GTG, que tem sido relatada para íntrons de outras espécies fúngicas, como *Lentinula edodes* (Hori et al., 1991), *A. niger* (Boel et al., 1984), *A. oryzae* (Gomi et al., 1991), *P. chrysogenum* (Smith et al., 1990), *Trichoderma reesei* (Chen et al., 1987). A seqüência do íntron localizado nessa posição em *L. bicolor* apresenta o sítio canônico 5' GTA e 3' TGA.

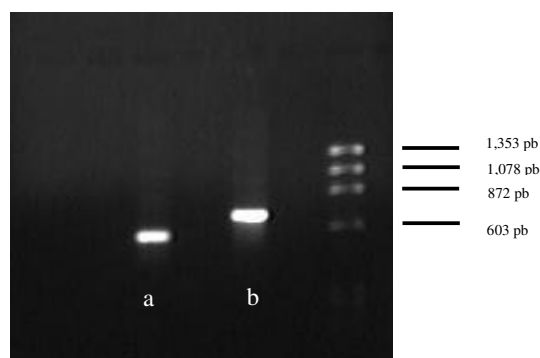
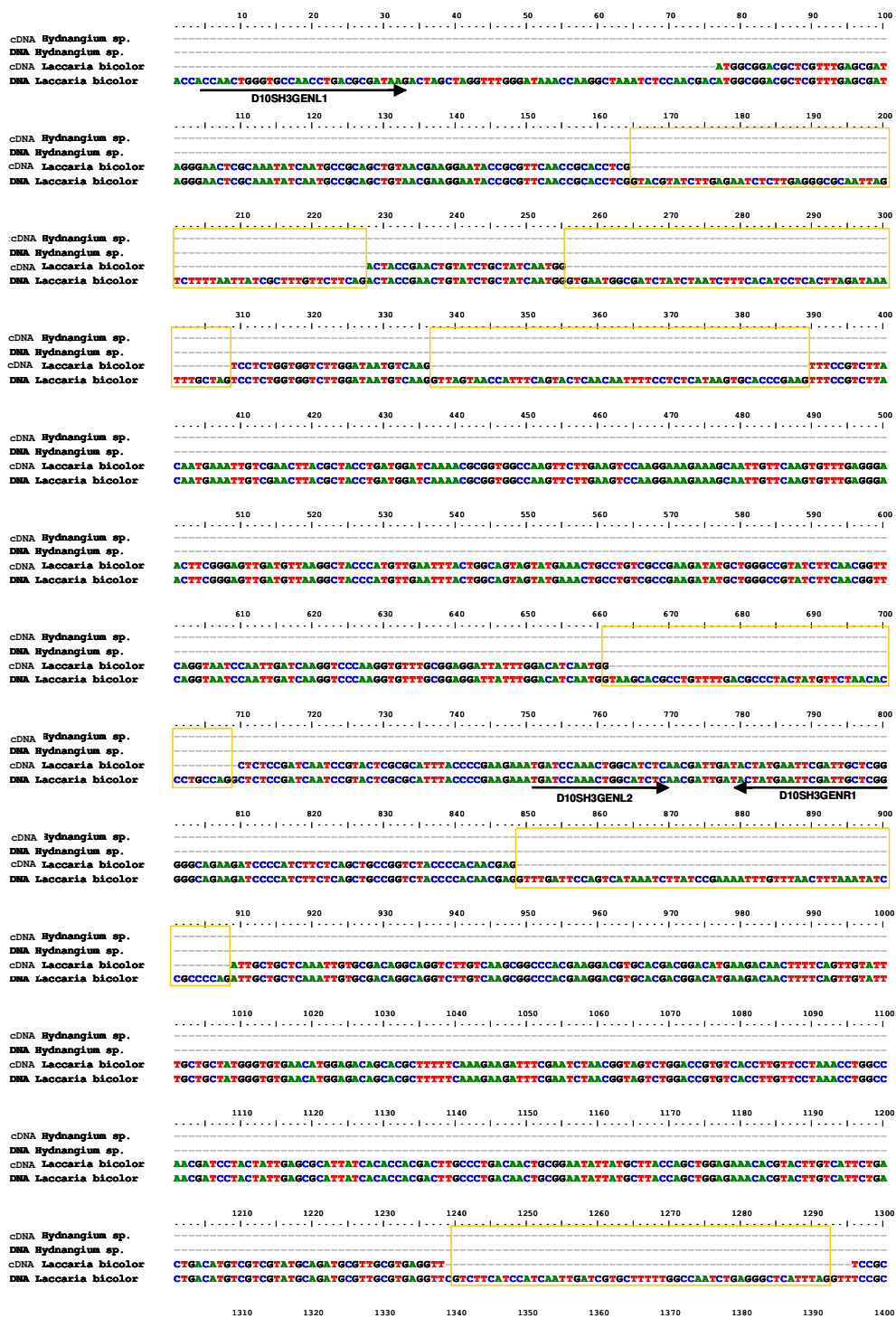


Figura 6. Amplificação dos genes *atp* e *aat* de *Hydnangium* sp. O fragmento a foi obtido por meio da amplificação utilizando os oligonucleotídeos D10GENL3/D10GENR3 e o fragmento b foi obtido por meio da amplificação utilizando os oligonucleotídeos H01GENL2/H01GENR2. O peso molecular dos fragmentos do marcador PhiX174/*Hae*III estão mostrados em pares de bases.

Em *Hydnangium* sp., o íntron localizado na posição 1.874 também apresenta o sítio típico de processamento 5' GT, mas em vez da sequência 5' GTA, comumente observada, observou-se a forma 5' GTC, como relatado para o fungo *L. edodes* (Hori et al., 1991). A extremidade 3' seguiu o padrão, que corresponde a 3' TAG. Em *L. bicolor*, o íntron localizado nessa posição apresenta o sítio 5' GTC, como observado em *Hydnangium* sp., e 3' CAG (Figura 7). Na região 3' do cDNA de ATP sintase de *Hydnangium* sp. foi identificada uma sequência AATAAA, característica de sítios de poliadenilação (Balance, 1986; Gilmartin, 2005) (Figura 7).

Em comparação com a região correspondente do gene *atp* em *L. bicolor*, dois íntrons foram identificados nas mesmas posições que os íntrons em *Hydnangium* sp. O íntron de 53 pb em *Hydnangium* sp. localiza-se na mesma posição do que o íntron em *L. bicolor* e apresenta o mesmo tamanho. O outro íntron em *L. bicolor* apresenta 57 pb, enquanto que na mesma posição no gene em *Hydnangium* sp. há um íntron de 65 pb.

A Tabela 4 mostra alguns exemplos de genes que foram caracterizados, quanto ao tamanho e número de íntrons e os respectivos sítios de processamento 5' e 3'. Além desses, estão mostrados os íntrons identificados nos genes *atp* e *aat* para *Hydnangium* sp. e para *L. bicolor*.



Continúa na próxima página.

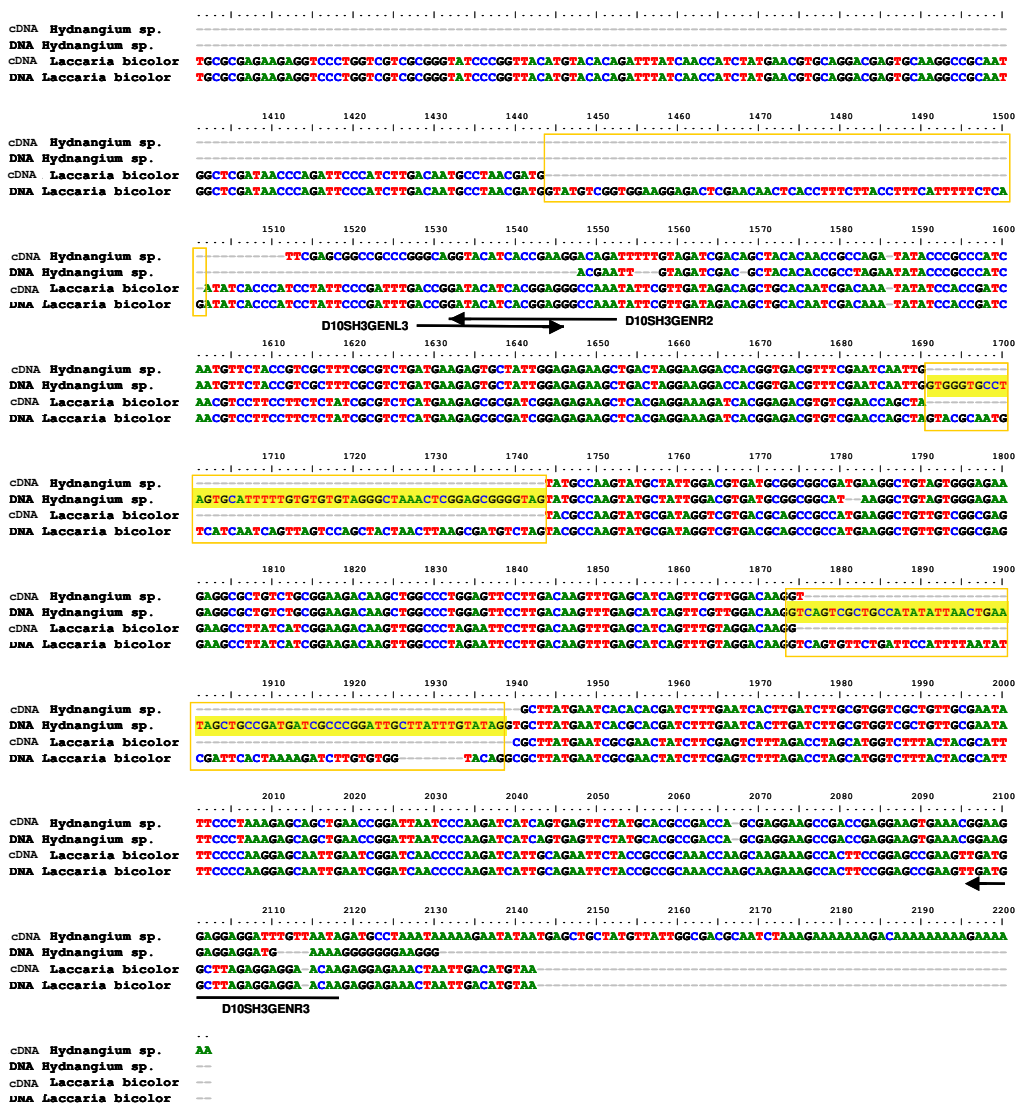


Figura 7. Alinhamento das seqüências de cDNA e DNA genômico de *Hydnangium* sp. e de *Laccaria bicolor* para o gene que codifica ATP sintase. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados estão sublinhadas. As direções das amplificações estão mostradas. As caixas em destaque correspondem às regiões de localização dos íntrons encontrados em *Laccaria bicolor* e preditos em *Hydnangium* sp. por meio do alinhamento das seqüências de cDNA de *Hydnangium* sp. e cDNA e DNA genômico de *Laccaria bicolor*. As regiões em realce representam as seqüências dos íntrons de *Hydnangium* sp. para a seqüência parcial do gene que codifica ATP sintase.

No caso do gene *aat* de *Hydnangium* sp., os três íntrons identificados também apresentaram tamanhos esperados para fungos. O íntron localizado na posição 983 possuindo tamanho de 52 pb, um íntron na posição 1.226 possuindo também um tamanho de 52 pb e um íntron na posição 1.399 possuindo tamanho de 46 pb. Os três íntrons possuem o sítio de processamento canônico 5' GTA, entretanto os dois íntrons com tamanhos de 52 pb possuem o sítio de processamento 3' TAG e o íntron com 46 pb possui 3' CAG (Figura 8 e Tabela 4).

Na região 3' do cDNA do gene *aat* de *Hydnangium* sp., também foi encontrada uma sequência AATAAA, localizada na posição 1.503, característica de sítios de poliadenilação (Balance, 1986; Gilmartin, 2005) (Figura 8).

Em comparação com a região correspondente do gene *aat* em *L. bicolor*, três íntrons foram identificados nas mesmas posições do que os íntrons em *Hydnangium* sp. Os íntrons de *L. bicolor* apresentando os tamanhos de 49, 56 e 50 pb localizam-se nas mesmas posições do que os íntrons de *Hydnangium* sp. com os tamanhos de 52, 52 e 46 pb.

As sequências dos genes *atp* e *aat* para os fungos basidiomicetos *Hydnangium* sp. e *L. bicolor* foram analisadas quanto à presença de íntrons. Não foram encontradas sequências divergentes do padrão canônico GT – AG dos sítios de processamento dos íntrons nas sequências analisadas, corroborando com a evidência de que a maioria dos íntrons de fungos segue o padrão canônico GT – AG. Entretanto, para *Neurospora crassa* a análise genômica identificou íntrons com sítios de processamento não canônico GC – AG (Rep et al., 2006). Os 27 íntrons identificados com a configuração GC – AG em *N. grassa* representaram 1,2 %, uma frequência maior do que a apresentada em *Caenorhabditis elegans* (0,6 %) e em mamíferos (0,7 %) (Rep et al., 2006).

Continua na próxima página.

Continuação da Figura 8.

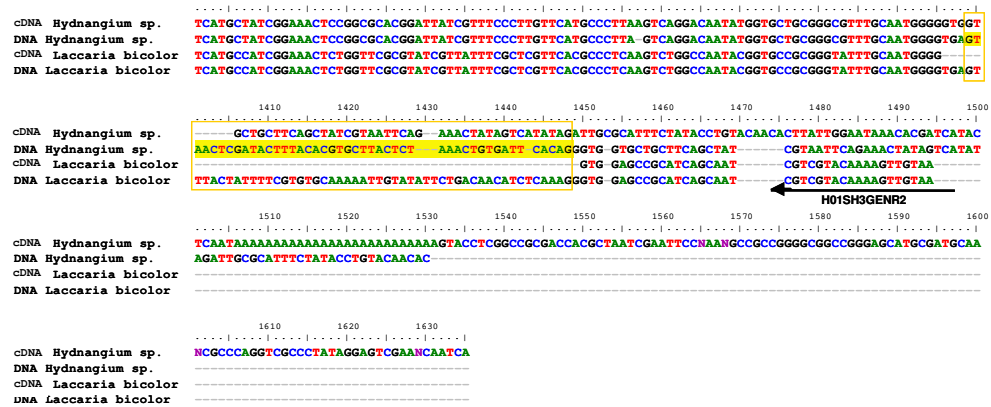


Figura 8. Alinhamento das seqüências de cDNA e DNA genômico de *Hydnangium* sp. e de *Laccaria bicolor* para o gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase. As regiões de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados estão sublinhadas. As direções das amplificações estão mostradas. As caixas em destaque correspondem às regiões de localização dos íntrons encontrados em *Laccaria bicolor* e preditos em *Hydnangium* sp. por meio do alinhamento das seqüências de cDNA de *Hydnangium* sp. e cDNA e DNA genômico de *Laccaria bicolor*. As regiões em realce representam as seqüências dos íntrons de *Hydnangium* sp. para a seqüência parcial do gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase.

Tabela 4. Número e posição de íntrons em genes de diferentes espécies de fungos.

Espécie	Gene	Nº de íntrons	Comprimento (bp)	Sítio 5' de processamento	Sítio 3' de processamento	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	<i>glaA</i>	4-5	169	GTACGT	CAG	Boel et al., 1984
	<i>niaD</i>	6	54	GTACGT	CAG	Unkless et al., 1992
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>glaA</i>	4	56	GTACGT	CAG	Hata et al., 1991
<i>Coprinus cinereus</i>	<i>dst1</i>	1	68	GTACGT	CAG	Terashima et al., 2005
<i>A. oryzae</i>	<i>glaA</i>	4	49	GTACGT	TAG	Hata et al., 1991
<i>A. niger</i>	<i>pmeA</i>	6	50	GTACGT	TAG	Khanh et al., 1991
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>lccK</i>	19	49	GTACGT	TAG	Okamoto et al., 2003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>acyA</i>	3	69	GTACGT	AAG	Smith et al., 1990
<i>Laccaria bicolor</i>	<i>atp</i>	9	63	GTACGT	CAG	Martin et al., 2008
<i>L. bicolor</i>	<i>aat</i>	5	49	GTACGT	CAG	
<i>P. chrysogenum</i>	<i>pgk</i>	2	62	GTATGT	CAG	Van Solingen et al., 1988
<i>A. niger</i>	<i>glaA</i>	4-5	55	GTATGT	CAG	Boel et al., 1984
	<i>pmeA</i>	6	54	GTATGT	CAG	Khanh et al., 1991
	<i>pacA</i>	2	201	GTATGT	CAG	MacRae et al., 1988
<i>A. niger</i>	<i>glaA</i>	4-5	75	GTATGT	TAG	Boel et al., 1984
	<i>pelA</i>	4	52	GTATGT	TAG	Kusters-van Someren et al., 1991
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	58	GTATGT	CAG	Martin et al., 2008
<i>A. niger</i>	<i>glaA</i>	8	65	GTATGG	CAG	Boel et al., 1984
<i>A. oryzae</i>	<i>amy1,2,3, amyA,B,C</i>	8	65	GTATGG	CAG	Wirsel et al., 1989
<i>L. bicolor</i>	<i>aat</i>	5	55	GTATGG	CAG	Martin et al., 2008
			56	GTATGA	CAG	
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	48	GTAAGC	CAG	Okamoto et al., 2003
<i>P. ostreatus</i>			55	GTAAGT	CAG	
	<i>lccK</i>	19	49	GTAAGT	TAG	Okamoto et al., 2003
<i>Hydnangium sp.</i>	<i>aat</i>	Indeterminado	52	GTAAGT	TAG	Este trabalho
			52	GTAAGT	TAG	
			46	GTAAGT	TAG	
<i>P. ostreatus</i>	<i>lccK</i>	19	57	GTACGC	TAG	Okamoto et al., 2003
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	53	GTACGC	TAG	Martin et al., 2008

Continuação da Tabela 4.

<i>A. niger</i>	<i>adlA</i>	3	57	GTGAGT	TAG	O'Connell et al., 1989
<i>Tuber borchii</i>	<i>ubi</i>	2	116	GTGAGT	TAG	Zeppa et al., 2001
<i>A. niger</i>	<i>niaD</i>	6	51	GTGAGA	CAG	Unkless et al., 1992
<i>A. oryzae</i>	<i>amdS</i>	6	51	GTGGGT	TAG	Gomi et al., 1991
	<i>glaA</i>	4	50	GTGAGC	CAG	Hata et al., 1991
<i>P. chrysogenum</i>	<i>acyA</i>	3	68	GTGAGT	CAG	Smith et al., 1990
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>cbh1</i>	2	63	GTGAGT	CAG	Shoemaker et al., 1983.
	<i>egl1</i>	2	70	GTGAGC	CAG	Pentillä et al., 1986
<i>Lentinula edodes</i>	<i>ras</i>	6	63	GTGCGC	CAG	Hori et al., 1991
		6	63	GTGTGG	CAG	Hori et al., 1991
	<i>pril</i>	2	52	GTGGGT	TAG	Hori et al., 1991
<i>Hydnangium</i> sp.	<i>atp</i>	Indeter- minado	53	GTGGGT	TAG	Este trabalho
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	53	GTGAAT	TAG	Martin et al., 2008
<i>L. edodes</i>	<i>ras</i>	6	52	GTCAGC	CAG	Hori et al., 1991
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	57	GTCAGT	CAG	Martin et al., 2008
<i>Hydnangium</i> sp.	<i>atp</i>	Indeter- minado	65	GTCAGT	TAG	Este trabalho
	<i>atp</i>	9	53	GTCTTC	TAG	Martin et al., 2008
<i>L. bicolor</i>	<i>aat</i>	5	52	GTTGGA	TAG	Martin et al., 2008
<i>Armillaria mellea</i>	<i>lac</i>	13	53	GTTGGT	TAG	Misiek & Hoffmeister, 2007
<i>L. bicolor</i>	<i>aat</i>	5	50	GTTTAC	AAG	Martin et al., 2008
	<i>atp</i>	9	60	GTTTGA	CAG	Martin et al., 2008
<i>A. mellea</i>	<i>lac</i>	13	52	GTTTGT	TAG	Misiek & Hoffmeister, 2007
<i>L. edodes</i>	<i>ras</i>	6	58	GTTAGT	TAG	Hori et al., 1991
<i>L. bicolor</i>	<i>atp</i>	9	53	GTTAGT	AAG	Martin et al., 2008

Os íntrons relativos aos genes para *Hydnangium* sp. estão em negrito.

A Figura 9 esquematiza a posição dos íntrons de *Hydnangium* sp. e de *L. bicolor* nos genes *atp* e *aat*. Nesta figura podemos visualizar a distribuição dos íntrons nos dois genes analisados em *L. bicolor* e parcialmente em *Hydnangium*

sp. A região correspondente em ambas as seqüências em *Hydnangium* sp. e em *L. bicolor* foram analisadas e foi observado o mesmo padrão de íntrons, com tamanhos iguais ou aproximados, localizados nas mesmas posições e todos seguindo o padrão canônico 5' GT – 3' AG nos sítios de processamento.

A seqüência de DNA do gene *atp* de *L. bicolor* possui um tamanho de 2.132 pb e contém nove íntrons. Quatro desses íntrons seguem o padrão canônico mais comum GTA (com tamanhos de 63 pb, 48 pb, 58 pb e 53 pb), enquanto que dois íntrons possuem a seqüência trinucleotídica GTT (53 pb e 60 pb), dois possuem a seqüência GTC (53 pb e 57 pb) e um possui a seqüência GTG (53 pb), no sítio de processamento 5'. No sítio de processamento 3', quatro possuem o padrão TAG, cinco possuem o padrão CAG e um a seqüência AAG (Figura 9).

A seqüência de DNA do gene *aat* de *L. bicolor* possui um tamanho de 1.484 pb e contém cinco íntrons. Três desses íntrons seguem o padrão canônico mais comum GTA (com tamanhos de 55 pb, 49 pb e 56 pb) e dois possuem a seqüência GTT (52 pb e 50 pb), no sítio de processamento 5'. No sítio de processamento 3', três possuem o padrão CAG, um o padrão TAG e um AAG (Figura 7 e 13).

Para as seqüências parciais dos genes correspondentes de *Hydnangium* sp., foram identificados dois íntrons no gene *atp* e três íntrons no gene *aat* (Figuras 7, 8 e 9). Como *L. bicolor* e *Hydnangium* sp. são espécies muito próximas, pertencentes à família Hydnangiaceae, é possível que haja o mesmo número de íntrons para os genes em estudo e, possivelmente, localizados nas mesmas posições nos genomas. Porém, a avaliação das seqüências completas dos genes *atp* e *aat* é necessária para confirmar o número correto de íntrons nesses genes em *Hydnangium* sp., pois a identificação correta de todos os íntrons é importante no estudo da organização desses genes (Davis et al., 2000).

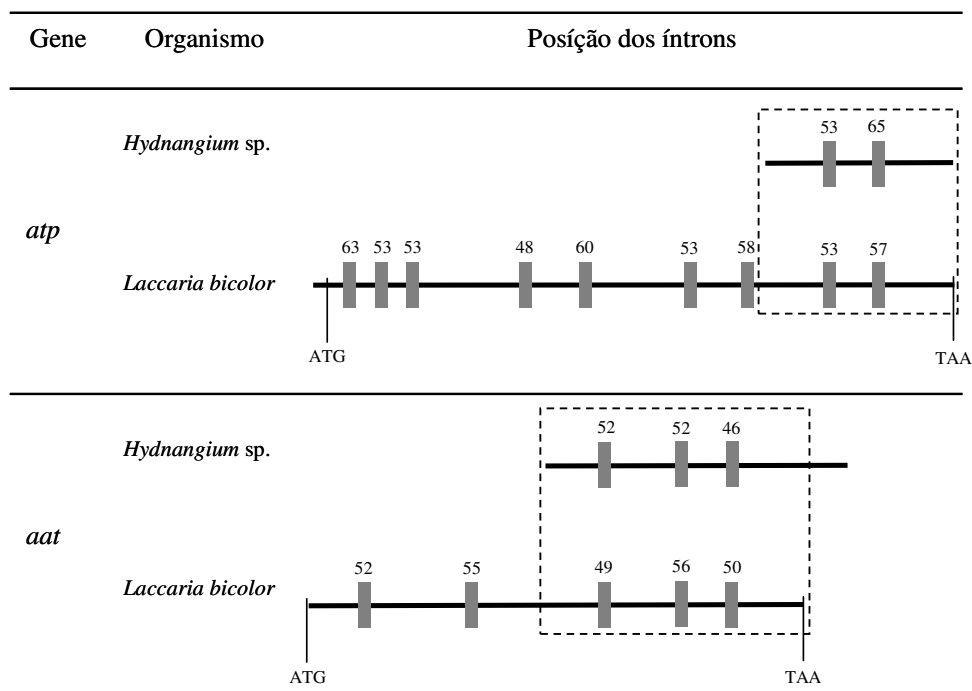


Figura 9. Posição dos íntrons identificados em *Hydnangium* sp. e em *Laccaria bicolor* para os genes *atp* e *aat*. As barras verticais correspondem aos íntrons, com o tamanho em pares de bases representado acima de cada íntron. A posição +1 correspondente ao códon de início da tradução ATG e o códon de terminação TAA estão representados nas seqüências completas dos genes *atp* e *aat* de *Laccaria bicolor*.

3. Análise filogenética dos genes que codificam ATP sintase e acetil-CoA acetiltransferase

Em *Hydnangium* sp., a seqüência de cDNA de parte do gene *atp* (594 pb) corresponde a uma ORF putativa com uma proteína deduzida de 126 aminoácidos, enquanto que a seqüência de cDNA de parte do gene *aat* (733 pb) processa uma ORF de 132 aminoácidos. Em *Laccaria bicolor*, a seqüência de cDNA do gene *atp* corresponde a uma ORF putativa de 1.554 pb, com uma proteína deduzida de 517 aminoácidos, enquanto que a seqüência de cDNA do gene *aat* corresponde a uma ORF de 1.218 pb, com uma proteína deduzida de 405 aminoácidos.

Para as análises filogenéticas, foram utilizadas as seqüências de aminoácidos deduzidas das seqüências correspondentes aos genes *atp* e *aat* obtidas após o *blast* com as seqüências de cDNAs dos genes de *Hydnangium* sp. (Tabelas 2 e 3).

A análise filogenética utilizando as seqüências deduzidas de polipeptídeos do gene *atp* permitiu observar também a separação dos grupos distintos, correlacionando diretamente com a categoria taxonômica a qual cada organismo pertence. A Figura 10 mostra a separação em dois ramos pertencentes a filos diferentes de fungos, Basidiomycota e Ascomycota. Dentre os fungos ascomicetos, foi verificada a separação nos subfilos Saccharomycotina e Pezizomycotina. Os fungos basidiomicetes também foram separados em dois subfilos, Agaricomycotina e Ustilaginomycotina. *Hydnangium* sp. e *L. bicolor* foram agrupados no mesmo ramo. Os dois pertencem à ordem Agaricales.

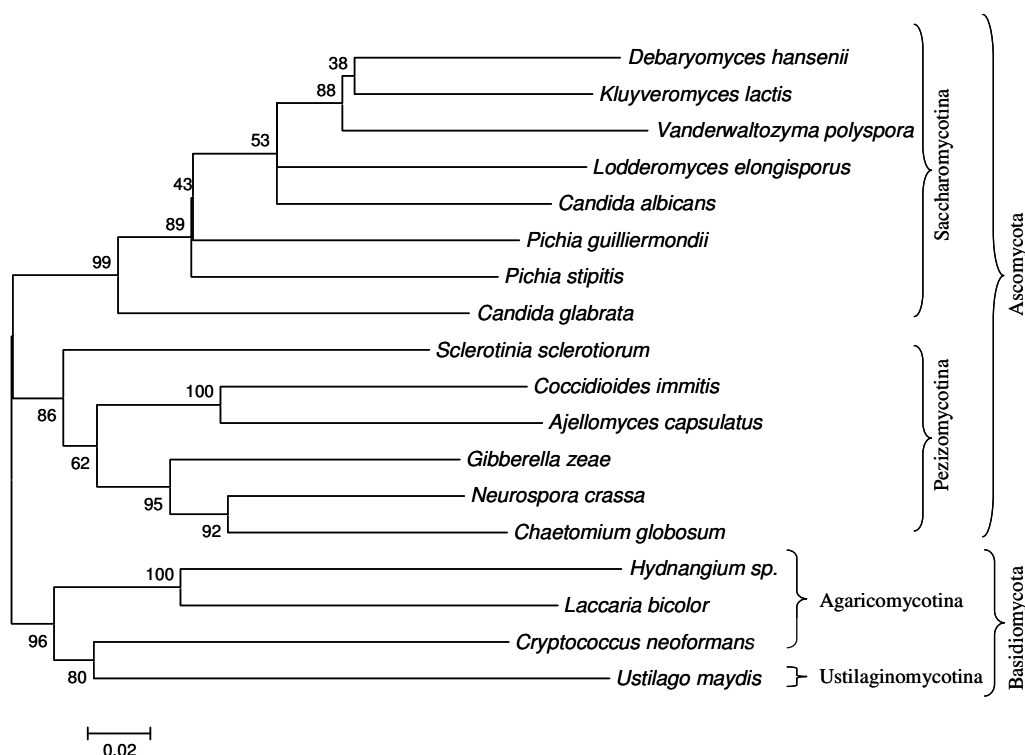


Figura 10. Análise filogenética da seqüência deduzida da proteína ATP sintase.

A árvore foi baseada na comparação de seqüências de polipeptídeos do gene *atp* de *Hydnangium* sp. com outras espécies. A construção foi

baseada no método de *Neighbor-joining* utilizando o modelo de substituição distância p. Os valores de *bootstrap* de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo, em cada uma das árvores construídas. A distância dos ramos está indicada na parte inferior.

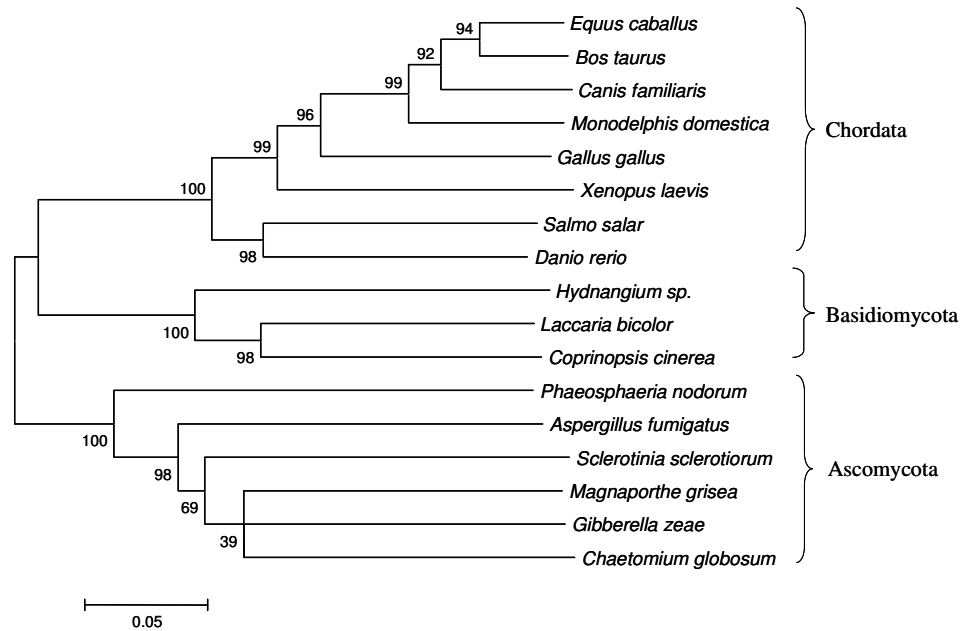


Figura 11. Análise filogenética da sequência deduzida da proteína acetil-CoA acetiltransferase. A árvore consenso foi baseada na comparação de seqüências de polipeptídeos do gene *aat* de *Hydnangium* sp. com outras espécies. A construção foi baseada no método de *Neighbor-joining* utilizando o modelo de substituição distância p. Os valores de *bootstrap* de 1000 réplicas estão indicados na parte superior de cada ramo, em cada uma das árvores construídas. A distância dos ramos está indicada na parte inferior.

A análise filogenética utilizando as seqüências deduzidas de polipeptídeos do gene *aat* permitiu observar também a separação dos grupos distintos, correlacionando diretamente com a categoria taxonômica a qual cada organismo pertence. A análise revelou a separação em grupos dos dois grandes reinos utilizados: Fungi e Animalia, por meio dos filos Basidiomycota, Ascomycota e Chordata (Figura 11). As seqüências utilizadas para essa análise contemplaram diversas espécies de fungos e de vertebrados, diferindo da análise para o gene *atp*, onde todos os organismos apresentados eram do reino Fungi.

Dentre os fungos, formaram-se dois grupos separando as espécies pertencentes ao filo Basidiomycota e Ascomycota. Nessas análises, *Hydnangium* sp. apresentou-se em um ramo irmão ao ramo de *L. bicolor* (Figuras 11). A análise filogenética indicou que as seqüências polipeptídicas de acetil-CoA acetiltransferase de *Hydnangium* sp. são similares com as proteínas correspondentes a acetil-CoA acetiltransferase de outros fungos.

Vários genes têm sido utilizados para a realização de análises filogenéticas. As seqüências dos genes correspondentes à subunidade seis do complexo da ATP sintase (*atp6*), tiveram sua relação filogenética construída para várias espécies de fungos da ordem Boletales (Kretzer & Bruns, 1999). As seqüências dos genes que codificam acetil-CoA acetiltransferase em fungos, bactérias, plantas e mamíferos também tiveram a análise filogenética realizada (Hiremath et al., 2006).

A relação filogenética proposta para as seqüências deduzidas de aminoácidos, para ambos os genes, separou corretamente os grupos, corroborando a classificação do fungo *Hydnangium* sp. como pertencente à mesma família que *L. bicolor*.

CONCLUSÕES

A síntese *in vitro* de ectomicorriza desenvolvida neste trabalho demonstrou a interação das hifas do fungo basidiomiceto *Hydnangium* sp. e as raízes de *Eucalyptus grandis* e o estabelecimento da ectomicorriza. As fases de formação da ectomicorriza entre *Hydnangium* sp. e *E. grandis* foram identificadas por meio de análises das estruturas características, como o manto e a rede de Hartig. A fase de colonização ocorreu após cinco dias de inoculação, a fase de diferenciação após 10 dias e a fase de funcionamento da ectomicorriza após 20 dias.

Foi avaliado o número e a posição dos íntrons do gene que codifica ATP sintase (*atp*) e do gene que codifica acetil-CoA acetiltransferase (*aat*), em *Hydnangium* sp. A sequência parcial do gene *atp* apresentou dois íntrons, enquanto que a sequência parcial do gene *aat* apresentou três íntrons.

Os íntrons identificados na sequência parcial do gene *atp* de *Hydnangium* sp. possuem tamanhos de 53 pb e 65 pb, localizados na posição 1.692 e 1.874 respectivamente, enquanto os íntrons identificados na sequência parcial do gene *aat* de *Hydnangium* sp. possuem tamanhos de 52 pb, 52 pb e 46 pb, localizados na posição 982, 1.226 e 1.399 respectivamente. Todos os íntrons analisados apresentaram sítios de processamento canônico, 5' GT – 3' AG, variando os nucleotídeos adjacentes à região do íntron.

A relação filogenética proposta para as sequências deduzidas de aminoácidos, para ambos os genes, separou corretamente os grupos, corroborando a classificação do fungo *Hydnangium* sp. pertencente a mesma família que *Laccaria bicolor*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A. M.; BALDÉ, A.; MAIA, L. C.; PAIS, M. S. (2008) Fungal transcript pattern during the preinfection stage (12 h) of ectomycorrhiza formed between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* roots, identified using cDNA microarrays. **Current Microbiology**. 57: 620-625.
- AEBI, M.; HORNIG, H.; PADGETT, R. A.; REISER, J.; WEISSMAN, C. (1986) Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. **Cell**. 47: 555-565.
- ALBRECHT, C.; ASSELIN, A.; PICHÉ, Y.; LAPEYRIE, F. (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. **Plant and Cell Physiology**. 35:104–110.
- ALLEN, M. F. (1991) **The Ecology of Mycorrhizae**. Cambridge University Press, 184p. (*on line books*).
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996) **Introductory Mycology**. 4th ed, New York: John Wiley & Sons. 869p.
- AMARANTHUS, M. P. (1998) The importance and conservation of ectomycorrhizal fungal diversity in forest ecosystems: lessons from Europe and the Pacific Northwest. **United States Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report**. 20p.
- AUGÉ, R. M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**. 11: 3-42.
- BALLANCE, D. J. (1986) Sequences important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast**. 2: 229–236.

- BALASUBRAMANIAN, S.; KIM, S. J.; PODILA, G. (2002) Differential expression of a malate synthase gene during the preinfection stage of symbiosis in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**. 154: 517-727.
- BEATON, G.; PEGLER, D. N.; YOUNG, T. W. K. (1984) Gasteroid basidiomycota of Victoria State, Australia. I. Hydnangiaceae. **Kew Bulletin**. 39: 499-508.
- BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. (2000) Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology**. 146: 1109-1117.
- BOEL, E.; HANSEN, M. T.; HJORT, I.; HØEGH, I.; FIIL, N. P. (1984) Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. **The EMBO Journal**. 3 (7): 1581-1585.
- BOUGHER, N., L.; TOMMERUP, I. C.; MALAJCZUK, N. (1993) Broad variation in developmental and mature basidiome morphology of the ectomycorrhizal fungus *Hydnangium sublamellatum* sp. nov. bridges morphologically based generic concepts of *Hydnangium*, *Podohydangium* and *Laccaria*. **Mycological Research**. 97: 613-619.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). Australian Systematic Botany. 13 (1): 79-148.
- BRUNDRETT, M. C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**. 154: 275-304.
- BRUNNER, I. & FREY, B. (2000) Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. **Environmental Pollution**. 108(2):121-128.
- BUCHER, M. (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. **New Phytologist**. 173: 11-26.
- BUEE, M.; ROSSIGNOL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 13(6): 693-698.
- CAMPOS, D. T. S. (2004) **Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. 82p.
- CHEN, C. M.; GRITZALI, M.; STAFFORD, D. W. (1987) Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Nature Biotechnology**. 5: 274-278.

- CLARIDGE, A. W.; TRAPPE, J. M.; CORK, S. J.; CLARIDGE, D. L. (1999) Mycophagy by small mammals in the coniferous forests of North America: nutritional value of sporocarps of *Rhizopogon vinicolor*, a common hypogeous fungus. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**. 169(3): 172-178.
- COELHO, I. S. (2008) **Identificação de genes expressos durante a fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* e transformação de fungos ectomicorrízicos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. 120p.
- COLPAERT, J. V. & VAN ASSCHE, J. A. (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**. 123: 325-333.
- COPPEN, J. J. W. (2002) ***Eucalyptus: The Genus Eucalyptus***. CRC Press, 450p. (on line books).
- CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 11: 1017-1028.
- COSTA, M. D.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. (2003) Ectomicorizas: a face oculta das florestas. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**. 29: 38-46.
- DAVIS, C. A.; GRATE, L.; SPINGOLA, M.; ARES JUNIOR, M. (2000) Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternative spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. **Nucleic Acids Research**. 28(8): 1700-1706.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 93(12): 6025-30.
- DOUGHTY, R. 2000. **The Eucalyptus: A natural and commercial history of the gum tree**. Forest Science. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 585p. (on line books).
- DUPLESSIS, S.; SORIN, C.; VOIBLET, C.; PALIN, B.; MARTIN, F.; TAGU, D. (2001) Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. **Current Genetics**. 39: 335-339.

- 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.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. (1993) **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford Science Publications. 228p.
- ELLIOT, M. A. & TALBOT, N. J. (2004) Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. **Current Opinion in Microbiology**. 7: 594–601.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Online Forestry. Acessado em dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- FELIPE, M. S. S.; AZEVEDO, M. O.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (1992) **Biologia Molecular de Fungos Filamentosos: construção de banco genômico e de cDNA**. Manual Técnico, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, Piracicaba, São Paulo. 99p.
- FINLAY R.D. & SÖDERSTRÖM, B. **Mycorrhiza and Carbon Flow to Soil**. In: ALLEN, M.F. Mycorrhizal Functioning, Chapman & Hall, London, 1992, pp134-160.
- FRETTEINGER, P.; DERORY, J.; HERRMANN, S.; PLOMION, C.; LAPEYRIE, F.; OELMÜLLER, R.; MARTIN, F.; BUSCOT, F. (2007) Transcriptional changes in two types of pre-mycorrhizal roots and in ectomycorrhizas of oak microcuttings inoculated with *Piloderma croceum*. **Planta**. 225: 331-340.
- GALLI, U.; SCHÜEPP, H.; BRUNOLD, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**. 92(2): 364-368.
- GILBERT, W. (1978) Why genes in pieces. **Nature**. 271 (5645): 501.
- GILMARTIN, G. M. (2005) Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. **Genes & Development**. 19: 2517-2521.
- GONÇALVES, S. C.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; FREITAS, H. (2008) Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates. **Mycorrhiza**. *In press*
- GURR, S. J.; UNKLES, S. E.; KINGHORN, J. R. (1987) The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In **Gene Structure in Eukaryotic Microbes**, p. 93–139. Edited by J. R. Kinghorn. Oxford: IRL Press.

- HALL, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95-98.
- HAKLEV, J. L. & LEWIS, D. H. (1969). The physiology of ectotrophic mycorrhizas. **Advances in Microbial Physiology**, 3, 53-59. In.: READ, D. J. & ARMSTRONG, W. (1972) A relationship between oxygen transport and the formation of the ectotrophic mycorrhizal sheath in conifer seedlings. **New Phytologist**. 71: 49-53.
- HARLEY, J. L. & SMITH, S. E. (1983) **Mycorrhizal symbiosis**. Academic Press, London.
- HAWKSWORTH, D. L. & ROSSMAN, A. Y. (1997) Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**. 87: 888-891.
- HIBBETT, D. S.; PINE, E. M.; LANGER, E.; LANGER, G.; DONOGHUE, M. J. (1997) Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 94: 12002-12006.
- HIBBETT, D. S.; GILBERT, L. B.; DONOGHUE, M. J. (2000) Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. **Nature**. 407: 506-508.
- HIREMATH, S. T.; BALASUBRAMANIAN, S.; ZHENG, J.; PODILA, G. K. (2006) Symbiosis-regulated expression of an acetyl-CoA acetyltransferase gene in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal of Botany**. 86: 1405-1416.
- HIRSCHMAN, J. E.; BALAKRISHNAN, R.; CHRISTIE, K. R.; COSTANZO, M. C.; DWIGHT, S. S.; ENGEL, S. R.; FISK, D. G.; HONG, E. L.; LIVSTONE, M. S.; NASH, R.; PARK, J.; OUGHTRED, R.; SKRZYPEK, M. et al. (2006) Genome Snapshot: a new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nucleic Acids Research**. 34: 442-445.
- HOBBIE, E. A. (2006) Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with total belowground allocation in culture studies. **Ecology**. 87: 563-569.
- HÖGBERG, M. N. & HÖGBERG, P. (2002) Extramatricial ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. **New Phytologist**. 154(3): 791-795.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/>. Acessado em 27 de janeiro de 2009.

- JAVELLE, A.; RODRIGUEZ-PASTRANA, B.; JACOB, C.; BOTTON, B.; BRUN, A.; ANDRE, B.; MARINI, A.; CHALOT, M. (2001) Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**. 505: 393–398.
- JENTSCHKE, G. & GODBOLD, D. L. (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. **Physiologia Plantarum**. 109(2): 107-116.
- JOHNSON, N. C. & GEHRING, C. A. (2007) **Mycorrhizas: symbiotic mediators of rhizosphere and ecosystem processes**. In: The rhizosphere: an ecological perspective (Cardon ZG, Whitbeck JL, eds). Academic Press, Amsterdam. (*on line book*).
- JONES, D. (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**. 205(1): 25-44.
- KÄMPER, J. et al. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**. 444(2): 97-101.
- KIM, S.J.; HIREMATH, S.T.; PODILA, G.K. (1998) Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**. 103:168-172.
- KINGHORN, J. R. & TURNER, G. (1992) **Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi**. Cambridge University Press. 259p.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. (2001) **Dictionary of the Fungi**. Wallingford, Great Britain, Cab Internacional. 655p.
- KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. (1991) Effect of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**. 117(4): 649-655.
- KRETZER, A. M. & BRUNS, T. D. (1999) Use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 13(3): 483–492.
- KRÜGER, A.; PESKAN-BERGHÖFER, T.; FRETTEING, P.; HERRMANN, S.; BUSCOT, F.; OELMÜLLER, R. (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*. **New Phytologist**. 163: 149-157.
- KUPFER, D. M.; DRABENSTOT, S. D.; BUCHANAN, K. L.; LAI, H.; ZHU, H.; DYER, D. W.; ROE, B. A.; MURPHY, J. W. (2004) Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi. **Eukaryotic Cell**. 3(5): 1088-1100.

- LAMBILLOITTE, R.; COOKE, R.; SAMSON, D.; FIZAMES, C.; GAYMARD, F.; PLASSARD, C.; TATRY, M.-V.; BERGER, C.; LAUDI, M.; LEGEAI, F.; KARSENTY, E.; DELSENY, M.; ZIMMERMANN, S.; SENTENAC, H. (2004) Large scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**. 164: 505–513.
- LANDEWEERT, R.; VEENMAN, C.; KUYPER, T. W.; FRITZE, H.; WERNARS, K.; SMIT, E. (2003) Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology**. 45: 283-292.
- LANFRANCO L.; BOLCHI, A.; ROS, E. C.; OTTONELLO, S.; BONFANTE, P. (2002) Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Physiology**. 130: 58-67.
- LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. (1991) Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 69: 342-346.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D. P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. (2005) Patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between Birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 18(7): 659-673.
- LIMA, W. P. (1993) **Impacto Ambiental do Eucalipto**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2nd ed.
- LÓPEZ, M. F.; MÄNNER, P.; WILLMANN, A.; HAMPP, R.; NEHLS, U. (2007) Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. **New Phytologist**. 174: 389–398.
- LUFTUS, B. J.; FUNG, E.; RONCAGLIA, P.; ROWLEY, D.; AMEDEO, P.; BRUNO, D.; VAMATHEVAN, J.; MIRANDA, M.; ANDERSON, I. J.; FRASER, J. A.; ALLEN, J. E.; BOSDET, I. E.; BRENT, M. R.; CHIU, R.; DOERING, T. L.; DONLIN, M. J.; D'SOUZA, C. A.; FOX, D. S.; GRINBERG, V.; FU, J.; FUKUSHIMA, M.; HAAS, B. J.; HUANG, J. C.; JANBON, G.; JONES, S. J.; KOO, H. L.; KRZYWINSKI, M. I.; KWON-CHUNG, J. K.; LENGELER, K. B.; MAITI, R.; MARRA, M. A.; MARRA, R. E.; MATHEWSON, C. A.; MITCHELL, T. G.; PERTEA, M.; RIGGS, F. R.; SALZBERG, S. L.; SCHEIN, J. E.; SHVARTSBEYN, A.; SHIN, H.; SHUMWAY, M.; SPECHT, C. A.; SUH, B. B.; TENNEY, A.; UTTERBACK, T. R.; WICKES, B. L.; WORTMAN, J. R.; WYE, N. H.; KRONSTAD, J. W.; LODGE, J. K.; HEITMAN, J.; DAVIS, R. W.;

- FRASER, C. M.; HYMAN, R. W. (2005) The genome of the Basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**. 307 (5713): 1321-1324.
- LUPATINI, M.; BONNASSIS, P. A. P.; STEFFEN, R. B. ; OLIVEIRA, V. L.; ANTONIOLLI, Z. I. (2008) Mycorrhizal morphotyping and molecular characterization of *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, an ectomycorrhizal fungus from *Eucalyptus*. **Mycorrhiza**. 18: 437-442.
- MACKAY, I. M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**. 10(3): 190-212.
- MALAJCZUK, N.; MOLINA, R.; TRAPPE, J. M. (1982) Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus* I. pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. **New Phytologist**. 91: 467-482.
- MANIATIS, T. & TASIC, B. (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. **Nature**. 418:236-243.
- MANKEL, A.; KRAUSE, K.; GENENGER, M.; KOST, G.; KOTHE, E. (2000) A hydrophobin accumulated in the Hartig' net of ectomycorrhiza formed between *Tricholoma terreum* and its compatible host tree is missing in an incompatible association. **Journal of Applied Botany**. 74: 95-99.
- MARMEISSE, R.; GUIDOT, A.; GAY, G.; LAMBILLIOTTE, R.; SENTENAC, H.; COMBIER, J.-P.; MELAYAH, D.; FRAISSINET-TACHET, L.; DEBAUD, J. C. (2004) *Hebeloma cylindrosporum* – a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. **New Phytologist**. 163: 481–498.
- MARTIN, F.; BOTTON, B. (1993). Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. **Advances in Plant Pathology**. 9: 83–102.
- MARTIN, F. & TAGU, D. (1999) Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In: Hock B, Varma A, eds. **Mycorrhiza**, 2nd edn. Berlin: Springer Verlag, 51–73.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals 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.; AERTS, A.; AHRÉN, D.; BRUN, A.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUÉE, M.; BROKSTEIN, P.; CANBÄCK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.; DANCHIN, E.G.J.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUCIC, E.; FREY-KLETT, P.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GÉRARD, J.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBÉ, J.; LIN, Y. C.; LEGUÉ, V.; LETACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; NICULITA-HIRZEL, H.; OUDOT-LESECQ, M.P.; PETER, G.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KÜES, U.; LUCAS, S.; VAN DE PEER, Y.; PODILA, G.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.; ROUZÉ, P.; SANDERS, I.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**. 452:88-92.
- MARTIN, F. (2008) Orchestrating morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**. 177(4): 839-841.
- MARX, D. H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. In: Antagonism of mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Phytopathology**. St. Paul. 59: 153-163.
- MARX, D. H. (1972) Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. **Annual Review of Phytopathology**. 10: 429-454.
- MASSICOTTE, H.B.; PETERSON, R.L.; MELVILLE, L.H. (1989) Hartig net structure of ectomycorrhizae synthesized between *Laccaria bicolor* (Tricholomataceae) and two hosts: *Betula alleghaniensis* (Betulaceae) and *Pinus resinosa* (Pinaceae). **American Journal of Botany**. 76: 1654-1667.
- MEDINA, P. X. L. (2001) **Célula hospedeira URA3- para a produção de proteínas recombinantes em *Kluyveromyces lactis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 36p.
- MELIN, E.; & NILSSON, H. (1952) Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal mycelium. **Sven. Bot. Tidskr.** 46: 280-285. In: Nehls, U.; Ecke, M.; Hampp, R. (1999) Sugar- and Nitrogen-Dependent Regulation of an *Amanita muscaria* Phenylalanine Ammonium Lyase Gene. **Journal of Bacteriology**. 181(6): 1931-1933.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A. M.; STOCCHI, V. (2004) Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia Americana* L.. **Current Genetics**. 46: 158-165.

- MEYER, F. H. (1973). Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: **Ectomycorrhizae** (eds G. C. Marks, and T. T. Kozlowski). Academic Press, New York, USA, 79-105.
- MOLINA, R.; MASSICOTTE, H.; TRAPPE, J.M. (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M.F. **Mycorrhizal functioning – an integrated plant – fungal process**. New York, Chapman and Hall, 357-423.
- MOORE, A. E. P.; MASSICOTTE, H. B.; PETERSON, R. L. (1989) Ectomycorrhiza formation between *Eucalyptus pilularis* Sm. and *Hydnangium carneum* Wallr. in Dietr. **New Phytologist**. 112: 193-204.
- MORTON, J. B. (1988) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. **Mycotaxon**. 32: 267-324.
- MOUNT, S. (2000) Genomic sequence, splicing, and gene annotation. **American Journal of Human Genetics**. 67: 788-792.
- MUCHOVEJ, R. M. C. & KASUYA, M. C. M. (1987) Temperature or aluminum level on mycorrhizal formation in *Pinus caribaea*. **Mycorrhizae in the next Decade Gainesville**, FL. P. 130.
- MUELLER, G. M. & AMMIRATI, J. F. (1993) Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales). II. Assessing phylogenetic relationships among *Laccaria*, *Hydnangium*, and other Agaricales. **American Journal of Botany**. 80: 322-329.
- MUELLER, G.M. & HOSAKA, K. (2006) **Biogeography and host preference of austral members of *Laccaria* - *Hydnangium*, a model clade of ectomycorrhizal fungi**. 8th International Mycological Congress. 21-25, Cairns Convention Centre Queensland, Australia.
- NEHLS, U.; BOCK, A.; ECKE, M.; HAMPP, R. (2001a) Differential expression of the hexose-regulated fungal genes *AmPAL* and *AmMst1* within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. **New Phytologist**. 150(3): 583 – 589.
- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; MAGEL, E.; HAMPP, R. (2001b) Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. **New Phytologist**. 150(3): 533-541.
- NEHLS, U. (2008) Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. **Journal of Experimental Botany**. 59(5): 1097-1108.
- NEILSON, D. 2000. The global *Eucalyptus* resource and some solid wood-panel product development issues. In: IUFRO Conference, Launceston, Australia.

- NG, W. L.; NG, T.P.; KWAN, H. S. (2000) Cloning and characterization of two hydrophobin genes differentially expressed during fruit body development in *Lentinula edodes*. **FEMS Microbiology Letters**. 185: 139-145.
- NILSEN, P.; BORJA, I.; KNUTSEN, H.; BREAN, R. (1998) Nitrogen and drought effects on ectomycorrhizae of Norway spruce [*Picea abies* L.(Karst.)]. **Plant and Soil**. 198(2): 179-184.
- OCHMAN, H.; GERBER, A. S.; HARTL, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. **Genetics**. 120: 621-623.
- PARLADÉ, J.; HORTAL, S.; PERA, J.; GALIPIENSO, L. (2007) Quantitative detection of *Lactarius deliciosus* extraradical soil mycelium by real-time PCR and its application in the study of fungal persistence and interspecific competition. **Journal of Biotechnology**. 128(1): 14-23.
- 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.
- PODILA, G. K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J. H.; HYMES, M. J. (2002) Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant and Soil**. 244: 117-128.
- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. (2002) Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. **Molecular Genetics and Genomics**. 266:858-864.
- POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E.; JORDAN, G.; DUTKOWSKI, G.; DA COSTA, J.; SILVA, E.; MCKINNON, G.; STEANE, D.; VOLKER, P.; LOPEZ, G.; APIOLAZA, L.; LI, Y.; MARQUES, C.; BORRALHO, N. (2004) Exploration of the *eucalyptus globulus* gene pool. **Eucalyptus in a Changing World**. Proc. of IUFRO Conf., Aveiro 11-15.
- RAIDL, S.; BONFIGLI, R.; AGERER, R. (2005) Calibration of Quantitative Real-Time Taqman PCR by Correlation with Hyphal Biomass and ITS Copies in Mycelia of *Piloderma croceum*. **Plant Biology**. 7(8): 713-717.
- RAIJ, B. van. (1991) **Fertilidade do Solo e Adubação**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda. 343p.
- RAMON, D.; CARRAMOLINO, L.; PATINO, C.; SANCHEZ, F.; PENALVA, M. A. (1987) Cloning and characterisation of the iospenicillin N synthetase

gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus nidulans*. **Gene**. 57: 171-181.

RAY, P. & ADHOLEYA, A. (2008) Correlation between organic acid exudation and metal uptake by ectomycorrhizal fungi grown on pond ash *in vitro*. **Biometals**. *In press*.

READ, D. J. & PEREZ-MORENO, J. (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? **New Phytologist**. 157 (3): 475-492.

REP, M.; DUYVESTEIJN, R. G. E.; GALE, L.; USGAARD, T.; CORNELISSEN, B. J. C.; MA, L.J.; WARD, T. J. (2006) The presence of GC-AG introns in *Neurospora crassa* and other euascomycetes determined from analyses of complete genomes: Implications for automated gene prediction. **Genomics**. 87: 338 – 347.

ROZEN, S. & SKALETISKY, 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, 365-386.

SALZER, P.; BONANOMI, A.; BEYER, K.; VÖGELI-LANGE, R.; AESCHBACHER, R. A.; LANGE, J.; WIEMKEN, A.; KIM, D.; COOK, D. R.; BOLLER, T. (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 13: 763–777.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 74:5463-5467.

SCHÜTZENDÜBEL, A. & POLLE, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**. 53(372): 1351-1365.

SELITRENNIKOFF, C. P. (2001) Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(7): 2883–2894.

SELOSSE, M. A. & LE TACON, F. (1998) The land flora: phototroph-fungus partnership? **Trends in Ecology & Evolution**. 13 (1): 15-20.

- SELOSSE, M. A.; BAUDOUIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**. 327: 639-648.
- SHI, L.; GUTTENBERGER, M.; KOTTKE, I. (2002) The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. **Mycorrhiza**. 12: 303-311.
- SIMARD, S. W.; PERRY, D. A.; JONES, M. D.; MYROLD, D. D.; DURALL, D. M.; MOLINA, R. (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**. 388(6642): 579-582.
- SMITH, D. J.; EARL, A. J.; TURNER, G. (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis is a 421 073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. **European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal**. 9: 2743-2750.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. (1997) **Mycorrhizal symbiosis**, 2a ed, Academic Press. London, 605p.
- STANKE, M. & WAACK, S. (2003) AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**. 32: 309-312.
- SPEACHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, P. C. (1982) A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**. 119: 158-163.
- 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 Interactions**. 14: 618-628.
- TAGU, D.; NASSE, B.; MARTIN, F. (1996) Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. **Gene**. 168: 93-97.
- TAGU, D.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; DE VRIES, O. M. H.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. (2001) Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**. 149 (1): 127-135.
- TAMASLOUKHT, M.; SÉJALON-DELMAS, N.; KLUEVER, A.; JAUNEAU, A.; ROUX, C.; BÉCARD, G.; FRANKEN, P. (2003) Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the

- developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. **Plant Physiology**. 131: 1468-1478.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24:1596-1599.
- TAYLOR, A. & ALEXANDER, I. (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. **Mycologist**. 19: 102-112.
- 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(22): 4673-4680.
- TRIGLIA, T.; PETERSON, M. G.; KEMP., D. (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. **Nucleic Acids Research**. 16(16): 8186.
- VAN TICHELEN, K.; VANSTRAELEN, T.; COLPAERT, J. (1999) Nutrient uptake by intact mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings: a diagnostic tool to detect copper toxicity. **Tree Physiology**. 19(3): 189-196.
- VITERBO, A. & CHET, I. (2006) *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. **Molecular Plant Pathology**. 7(4): 249-258.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*–*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **Plant Journal**. 25:181-191.
- VOZZO, J.A. & HACKSKAYLO, E. (1971) Inoculation of *Pinus caribea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. **Forest Science**. 17: 239-241.
- WHITEFORD, J. R. & SPANU, P. D. (2002) Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. **Molecular Plant Pathology**. 3(5): 391-400.
- WIEMKEN, V. & BOLLER, T. (2002) Ectomycorrhiza: gene expression, metabolism and the wood-wide web. **Current Opinion in Plant Biology**. 5 (4): 355-361.
- WIEMKEN, V. (2007) Trehalose synthesis in ectomycorrhizas – a driving force of carbon gain for fungi? **New Phytologist**. 174: 228-230.
- WILCOX, H.E. (1990) Mycorrhizal associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (Ed.). **Biotechnology of plant-microbe interactions**. New York: McGraw-Hill, 227-255.

- WIPF, D.; BENJDIA, M.; TEGEDER, M.; FROMMER, W. B. (2002) Characterization of a general amino acid permease from *Hebeloma cylindrosporum*. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**. 528: 119–124.
- WOOD, V.; GWILLIAM, R.; RAJANDREAM, M.-A.; LYNE, M.; LYNE, R.; STEWART, A. et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature**. 415: 871-880.
- WÖSTEN, H.A.B. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annual Review of Microbiology**. 55: 625-646.
- WU, T.; HAO, W.; LIN, X.; SHI, Y. (2002) Screening of arbuscular mycorrhizal fungi for the revegetation of eroded red soils in subtropical China. **Plant and Soil**, 239: 225-235.
- ZARB, J. & WALTERS, D. R. (1995) Polyamine biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* exposed to zinc. **Letters in Applied Microbiology**. 21(2): 93-95.
- ZARETSKY, M.; SITRIT, Y.; MILLS, D.; ROTH-BEJERANO, N.; KAGAN-YUR, 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.
- ZIPCODEZOO. Genus *Hydnangium*. BayScience Foundation, Inc. Disponível na internet via <http://zipcodezoo.com/>. Acessado em: 14 de janeiro de 2009.